



*Departamento de Farmacología y Terapéutica*

*Facultad de Medicina*

*Universidad Autónoma de Madrid*

**XENOBIÓTICOS Y TOXINAS URÉMICAS EN LA  
ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.  
ACUMULACIÓN Y EFECTOS DEL BISFENOL A Y S.  
USO DE PROBIÓTICOS PARA LA PREVENCIÓN DE LA  
ACUMULACIÓN DE TOXINAS DE ORIGEN  
INTESTINAL**

**TESIS DOCTORAL**

**Alberto Ruiz Priego**

Madrid, 2021



*Departamento de Farmacología y Terapéutica*

*Facultad de Medicina*

*Universidad Autónoma de Madrid*

**XENOBIÓTICOS Y TOXINAS URÉMICAS EN LA  
ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.  
ACUMULACIÓN Y EFECTOS DEL BISFENOL A Y S.  
USO DE PROBIÓTICOS PARA LA PREVENCIÓN DE LA  
ACUMULACIÓN DE TOXINAS DE ORIGEN INTESTINAL**

Memoria presentada por

**Alberto Ruiz Priego**

para optar al Grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

**Directores de Tesis:** Dr. Emilio González Parra y Dr. Sebastián Mas Fontao

**Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz**

**Universidad Autónoma de Madrid**

*A mis abuelos Antonia y Frasquito.*

*A mis padres, hermanos y familia.*

*A Raquel.*

## AGRADECIMIENTOS

Llegó el final de una etapa, LA TESIS, esa gran protagonista cuando entras al laboratorio y todos comentan si te lo has pensado bien. Al principio no sabes de que están hablando, pero con el tiempo te das cuenta y eres tú el que haces esa misma pregunta a los nuevos, porque sí, pasas de ser novato a veterano en menos de lo que se tarda en ir a tomarte el primer café. El café, uno de los grandes aliados y culpables de las líneas siguientes, pero también entran en escena las comidas, meriendas y alguna que otra cerveza, pero, sobre todo, personas increíbles que han hecho posible que lo importante haya sido el camino recorrido hasta llegar aquí.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de Tesis, el Dr. Emilio González Parra y el Dr. Sebastián Mas la confianza depositada para poder desarrollar con ellos los diversos proyectos realizados. EMILIO, gracias por ser tan buen profesional y haberme dado la oportunidad de conocer y evolucionar en la investigación clínica. SEBAS, gracias por haber sido tan honesto y ayudarme en todo lo posible, y como ya sabes, siempre nos quedará Granada.

A la Fundación Conchita Rábago y patronato, por haberme dado la oportunidad de ser uno de sus becados y poder así desarrollar mi Tesis doctoral. En especial a Marta, por haberme apoyado tanto en lo personal como en lo profesional, gracias.

Al Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz. Aún recuerdo mi primer día entrando por las puertas giratorias, ascensores 10 y 11, colas kilométricas... venga, actitud ante todo y a subir andando al 4º piso (¡en realidad hay un espaciotemporal que hace que sean 10 pisos por lo menos!). Entré al pasillo de la 4ª planta buscando el “laboratorio de nefrología”, ¡bendita pregunta! eran como 4 laboratorios juntos, menos mal que me tocó el fácil, el de Caramelo. Una vez dentro, estaba un crack y más importante todavía, una de las mejores personas que han pasado por la Funda, CRISTIAN, gracias por todo lo que me enseñaste en el tiempo que coincidimos, sabes lo mucho que te aprecio y lo feliz que estoy de que te vaya bonito. En el transcurso de las presentaciones en Caramelo, se escuchó un vozarrón por el pasillo, era KIKE, mi mentor los primeros meses en el laboratorio, gracias por enseñarme todo lo que sabías, por enseñarme que si había que pedir o preguntar algo se hace y punto, gracias. El siguiente instante fue el momento del café, en esa gran primera reunión en el pasillo recopilando a gente conocí a dos de las personas más importantes en esta etapa, MORGUI y SANDRA. Señor MORGADO, lo que me costó aprenderme tu nombre, me faltan las palabras para agradecer todo lo que me has enseñado, pero sobre todo apoyado en estos años. Gracias por ser mi confidente y tener siempre tiempo para un café, unas risas o lo que surja, gracias de corazón amigo. SANDRA, qué te voy a decir que no sepas, solo tengo palabras de agradecimiento y cariño. Gracias por haber perdido el tiempo (como te decía yo) conmigo y haberme enseñado gran parte de lo que he aprendido estos años en el laboratorio. Eres una luchadora donde las haya.

Los siguientes días y meses se fueron consolidando con el equipo desayuno, en el que no podía faltar nuestra capitana SUSANA (la buena), creo que le caí bien al principio, ella dice que fue por ir a buscarle la cuchara del café... desde entonces fui peloti para ella. Gracias de verdad por haberme aguantado en todo, porque te he gastado el nombre con tanta pregunta, pero es lo que tiene saberlo todo, eres un todoterreno con un corazón enorme. Otro de los elementos fundamentales de nuestro gran equipo desayuno, DIEGO medio-médico, aunque ya te puedo llamar 5/6 médico. Eres otro de los grandes todoterrenos de la Funda, gracias por todos los momentos vividos estos años, por las risas en los cafés, comidas, alguna que otra caña, cena y viaje. Eres increíble y te va a ir genial en tu nueva etapa, ya sabes, nos tienes que contratar a todos. Y no podían faltar dos integrantes del equipo Juan. MEL, canaria irrepitible con una fuerza descomunal, al final no conseguí que te tomaras el liquidito del yogurt antes de que te fueras a Córdoba, pero no te preocupes que seguiré insistiendo. ¡Qué bien nos lo pasamos en el congreso de Copenhague y en tu boda! Y CRISTINA, otra trabajadora incansable, eres una crack y conseguirás todo lo que te propongas. Mención aparte se merecen los dos cordobeses que llegaron a inicios del 2018 y se han llevado un trocito de mí. CARMEN, mi paisana, qué corazón y garra tienes. Gracias por todas las charlas entre café y café, por ofrecerme una mano siempre que la he necesitado y por el apoyo que me has dado, sabes que te quiero mucho y te admiro. JULIO, amigo, sabes que eres un grande y tienes un corazón que no te cabe en el pecho. Solo decirte que eres una de las personas que más admiro en la vida, lo das todo por los tuyos. Trabajador, honrado, pero sobre todo buena gente, siempre con una sonrisa ante todo. Qué buenos recuerdos nos quedan e historias por contar. Y RAKA, ay Raka, que ya te queda menos a ti. Gracias por sacarme siempre una sonrisa, incluso en los peores momentos, y ayudarme siempre que lo he necesitado. Gracias por todos los momentos vividos y por hacer que el camino haya sido más ameno y divertido. Como se dice en mi tierra, eres un tros de pa, gracias rakita.



Después, los laboratorios sufrieron ciertas modificaciones y me acogió MARTA en su laboratorio. Muchísimas gracias por todo el apoyo y medios que me has dado durante este tiempo, y a sus chicos por los momentos vividos. Laboratorio de AO, siento si alguna vez he sido pesado o molesto, pero siempre lo hacía con buena intención, gracias a todos. Laboratorio de CJL, las mismas palabras que para el de AO, gracias, en especial a Carmencita, conchi, que ya te queda nada también. Eres una crack y te irá genial, sino siempre nos quedará el perreo, y a tu directora de orquesta, NERE, qué te voy a decir, que eres una monstrea, gracias por todos los consejos durante estos años. DIEGO piscinas, gracias por todo, ahora te toca contratarme cuando termine todo esto. Laboratorio de mi JULIA, gracias por alegrarme todas las mañanas con esa energía, mi compañera de pádel, este año era el nuestro, pero el COVID no nos ha dejado ganar el campeonato. Gracias por todo lo que nos ayudas en el laboratorio, tienes un corazón enorme. Al resto de laboratorios, muchas gracias.

Gracias también a todo el personal de la FJD, en especial a Santi y Abel por ponernos los mejores desayunos de la Funda, por esas minicharlas y chistes. SANTI, tranquilo que este año sube el Rayo y el Mallorca. Y como no, a los pacientes que han participado en los estudios de esta tesis, ya que sin ellos no habría sido posible, en especial para los de la FJD, por haber tenido un contacto estrecho con ellos y haber sido tan generosos en todo lo que les solicitaba, gracias.

A todos los amigos que he tenido la suerte de conocer durante esta época. DIEGO, mis hijos, desde que nos conocimos en el máster y hasta ahora siempre has estado ahí cuando lo he necesitado. Gracias por esa alegría que transmites y todos los momentos vividos, nos quedan pendientes más carnavales junto a IRENE, pero esta vez sin esperas en el aeropuerto. LUCÍA, empezaste como pikachu pero ya te has pasado todos los niveles, ya te queda menos a ti también, un último empujón y lo tenemos. MARÍA, mier...coles, sabes que tienes un arte que no se puede aguantar, por tomarte la vida siempre con humor. Sigue así y no cambies nunca. JOSE LUIS, padre, ya no se si eres gallego, granaino o madrileño, pero lo que si sé es que yo me llevo un trocito de México conmigo. IAGO, el gran orador del grupo, que serían las comidas y cenas sin tus conversaciones inverosímiles a la par que emocionantes. Gracias por todos los consejos y por sacar siempre el lado bueno de las cosas, que sepas que aún queda pendiente esa colaboración. ANNA, por esa sonrisa maravillosa que paseas por bandera, lo mejor está por venir. Gracias por todos los momentos vividos chicos.

A mis amigos, JAVI e IRENE. Desde pequeños en el cole hasta aquí hemos ido quemando etapas. Gracias por el apoyo que me habéis dado desde que tengo uso de consciencia. A MANOLO, desde aquel disfraz de mago en parvulitos hasta ahora, gracias. A JOAN, mi enfermero sexy favorito, gracias por el apoyo en la distancia. A ANDREA, PATRI y RAQUEL, equipo UIB, ya vamos siendo menos predocs y más doctores en el grupo, gracias por todos los consejos, sobre todo en esta última etapa que parece que no llega el final, pero al final todo llega. Otro capítulo más que sumar a nuestra amistad y los que nos quedan.

Gracias a mi familia, ya que sin su apoyo todo esto no hubiese sido posible. A mis abuelos, ANTONIA y FRASQUITO, por ser el mayor ejemplo de superación, por los valores que me habéis enseñado, gracias. A mi madre, por ser una de las personas más fuertes que conozco y por enseñarme que no hay que rendirse nunca ante las adversidades y hay que ser feliz en cada instante de la vida, gracias mamá, y a TONI por cuidarla tanto y hacerla feliz. A mi hermano, JORGE, la parte racional de la familia. Te esperan cosas maravillosas y yo estaré ahí para apoyarte como tú has hecho conmigo en todo lo que necesites. A mi padre, por enseñarme una de las frases más importantes de la vida, TODO PASA POR ALGO, gracias papá. A mi hermana SANDRA, por ese huracán tan lleno de vida, no cambies porque eres todo dulzura. A PAQUITA, por haberme dado tantos consejos sobre la vida y por ver siempre la parte positiva de las cosas. A mi MADRINA, tío FELIPE y primos SERGIO e IRENE, gracias por apoyarme en todas las decisiones que he ido tomando a lo largo de este tiempo. A mi familia política, GOYO, MANOLI, BEA, ROBER, ADRIÁN, POLI y MARIAN, por acogerme como a uno más desde el principio y por estar siempre preocupados tanto de mí como de mi familia, gracias.

RAQUEL, no hay palabras que describan todo lo que has hecho por mí durante estos años. Por aguantarme en los peores momentos haciéndome ver la parte positiva de las cosas, porque sin tu ayuda nada de esto habría sido posible. Por empezar a formar nuestra pequeña familia con Rulo. Por eso vida mía, por el día a día. Por enseñarme a ver el cielo más azul. Por aguantar mis malos ratos y manías. Por conservar secretos en ningún baúl. Por ser mi compañera y darme tu energía. No cabe en una vida mi gratitud. Eres magia amor, gracias (...and back).

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>AGEs</b>	Productos finales de glicación avanzada
<b>ARE</b>	Elementos de respuesta antioxidante
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ATG</b>	Autophagy-related genes
<b>BCA</b>	Bicinconinico
<b>BPA</b>	Bisfenol A
<b>BPF</b>	Bisfenol F
<b>BPS</b>	Bisfenol S
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CETP</b>	Células epitelio-tubulares proximales
<b>CTGF</b>	Factor de crecimiento de tejido conectivo
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DP</b>	Diálisis peritoneal
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señal extracelular
<b>EPIRCE</b>	Epidemiología Insuficiencia Renal Crónica en España
<b>ERC</b>	Enfermedad renal crónica
<b>ERCT</b>	Enfermedad renal crónica terminal
<b>ER</b>	Receptor estrogénico
<b>ERR<math>\gamma</math></b>	Receptor $\gamma$ relacionado con estrógenos
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>FG</b>	Filtrado glomerular
<b>GP<math>\alpha</math></b>	Receptores asociados a proteínas G
<b>GSH</b>	Glutación
<b>HD</b>	Hemodiálisis
<b>HDF</b>	Hemodiafiltración
<b>HF</b>	Hemofiltración

<b>HO-1</b>	Hemoxigenasa -1
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HPV-16</b>	Virus del papiloma humano 16
<b>IAA</b>	Ácido 3 indolacético
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intercelular 1
<b>IS</b>	Indoxil sulfato
<b>IL6</b>	Interleuquina -6
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleuquina-1 $\beta$
<b>JAK1/2</b>	Quinasas Jano 1/2
<b>KDIGO</b>	Kidney disease improving global outcomes
<b>KoA</b>	Coeficiente transferencia de masa
<b>Kuf</b>	Coeficiente de ultrafiltración
<b>LC3</b>	Proteína asociada a microtúbulos 1 de cadena ligera 3
<b>LIR</b>	Regiones de interacción de LC3
<b>MAPKs</b>	Quinasas activadas por mitógenos
<b>MCP-1/CCL2</b>	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
<b>MDA</b>	malondialdehído
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>mTORC1</b>	Mammalian target of rapamycin complex 1
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear de transcripción $\kappa$ B
<b>NQO1</b>	NAD(P)H quinona oxireductasa
<b>Nrf2</b>	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
<b>OH</b>	Radicales hidroxilos
<b>OTUs</b>	Unidad taxonómica operativa
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Superóxido
<b>PAS</b>	Ácido peryódico de Schiff
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva
<b>pCS</b>	p-cresol sulfato
<b>PI3K</b>	Complejo de la 3-quinasa de clase III

<b>PN</b>	Polinefrona
<b>PS</b>	Polisulfona
<b>PTH</b>	Parathormona
<b>RANTES/CCL5</b>	Regulated on activation, normal T expressed and secreted
<b>RNS</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SNARE</b>	Receptor soluble de la proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida
<b>SOD</b>	Superoxido dismutasa
<b>STAT</b>	Proteína activadora de transcripción
<b>TEM</b>	Transición epitelio mesénquima
<b>TFG</b>	Tasa filtrado glomerular
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante- $\beta$
<b>TMAO</b>	Trimetilamina N-óxido
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	Factor necrosis tumoral $\alpha$
<b>TWEAK</b>	Citoquina inductora de apoptosis semejante a TNF
<b>TX</b>	Trasplante renal
<b>T<math>\beta</math>RI</b>	Receptor tipo I de TGF- $\beta$
<b>T<math>\beta</math>RII</b>	Receptor tipo II de TGF- $\beta$
<b>ULK1</b>	Unc-51 like autophagy activating kinase
<b>UO</b>	Obstrucción unilateral del uréter
<b>VSP34</b>	Class III phosphoinositide 3-kinase vacuolar protein sorting 34
<b>3MA</b>	3 Metiladenina

# ÍNDICE

---

# ÍNDICE

<b>RESUMEN/ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>1. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA .....</b>	<b>7</b>
1.1. Enfermedad renal crónica: definición y situación actual .....	7
1.2. Mecanismos responsables de daño renal.....	9
1.3. Características clínicas del paciente con enfermedad renal crónica.....	14
1.4. Técnicas de hemodiálisis.....	15
1.5. Toxinas urémicas.....	20
<b>2. TOXINAS URÉMICAS EXÓGENAS SINTÉTICAS: BISFENOLES.....</b>	<b>24</b>
2.1. BISFENOL A.....	24
2.2. BISFENOL S COMO SUSTITUTO DEL BISFENOL A .....	29
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>1. ENSAYOS CLÍNICOS EN PACIENTES EN DIÁLISIS .....</b>	<b>41</b>
1.1. Población de estudio agudo .....	41
1.2. Diseño de estudio agudo .....	41
1.3. Población de estudio crónico.....	42
1.4. Diseño de estudio crónico .....	43
1.5. Técnica de diálisis .....	43
1.6. Dializadores.....	44
1.7. Monitores de diálisis .....	44
1.8. Obtención de muestras biológicas y preparación .....	44
1.9. Extracción de bisfenoles del plasma y determinación mediante espectrometría de masas.....	45
1.10. Caracterización del contenido de BPS y BPA en fibras de los dializadores mediante Resonancia Magnética Nuclear .....	46
<b>2. ENSAYOS CLÍNICOS EN PACIENTES RENALES EN ESTADIOS III-IV .....</b>	<b>46</b>
2.1. Población de estudio.....	47
2.2. Diseño de estudio .....	47
2.3. Parámetros bioquímicos .....	48
2.4. Obtención y preparación de muestras biológicas .....	48
2.5. Extracción de toxinas urémicas del plasma y determinación mediante espectrometría de masas .....	48
2.6. Extracción de ADN de heces para determinación de microbiota.....	49
2.7. Procedimiento metagenómica ARN ribosómico 16S.....	49



2.8 Análisis bioinformático .....	50
3. MATERIALES Y MÉTODOS DE ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .....	50
3.1. Mantenimiento de las células en cultivo .....	50
3.2. Cultivos celulares .....	50
3.3. Tratamiento de los cultivos celulares con bisfenoles (BPA y BPS).....	51
3.4. Tratamiento de los cultivos celulares con inhibidores/activadores de la autofagia.....	52
3.5. Evaluación de la toxicidad <i>per se</i> .....	52
3.6. Estudios de expresión proteica .....	52
3.7. Estudios de expresión génica .....	53
4. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> .....	55
4.1. Modelo de nefrectomía subtotal (5/6 Nx) .....	55
5. ESTUDIOS DE HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA.....	57
5.1. Morfología renal.....	57
5.2. Inmunohistoquímica.....	58
5.3. Inmunofluorescencia .....	59
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	60
<b>RESULTADOS</b> .....	61
1. Efecto del BPA en células epiteliales del túbulo proximal renal humano (HK2) .....	63
2. Evaluación del efecto del BPA en un modelo animal de nefrectomía 5/6 .....	67
3. Evaluación del efecto del BPS en células epiteliales del túbulo proximal renal humano (HK2) como alternativa al BPA .....	79
4. Estudio agudo y crónico de los niveles plasmáticos de BPS como alternativa segura al BPA en pacientes con ERCT .....	83
5. Evaluación de la modificación de la microbiota sobre las toxinas urémicas en el paciente con enfermedad renal crónica .....	89
<b>DISCUSIÓN</b> .....	95
1. Efecto del bisfenol A sobre la enfermedad renal crónica.....	97
2. Evaluación del bisfenol S como alternativa al bisfenol A en el paciente renal en diálisis	103
3. Evaluación de la intervención con probióticos durante 6 meses en el paciente con ERC en estadios III-IV .....	107
<b>CONCLUSIONES</b> .....	111
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	115
<b>ANEXOS</b> .....	139

# **RESUMEN/ABSTRACT**

---

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) es una enfermedad multifactorial. Existen diversos factores que contribuyen a la progresión de esta patología, como las toxinas urémicas, que pueden encontrarse incrementadas en los pacientes de ERC como consecuencia, por ejemplo, de una disbiosis intestinal. Por otro lado, existen moléculas ubicuas en el ambiente que pueden resultar tóxicas para los enfermos con ERC, en especial para aquellos que se encuentran en estadios más avanzados. Entre estas moléculas destaca el bisfenol A (BPA), la cual se acumula en el organismo de estos pacientes debido a su eliminación renal. Actualmente, la industria dispone de alternativas a esta molécula, como es el bisfenol S (BPS), que, a pesar de ser estructuralmente similar al BPA, es más termolabile. No obstante, los estudios de los posibles efectos del BPS en humanos son escasos, en especial en la ERC. Los estudios *in vitro* e *in vivo* sobre la exposición a BPA confirman que esta molécula es capaz de acelerar la progresión de la enfermedad renal a través del incremento del estrés oxidativo y del bloqueo del flujo autofágico, favoreciendo así procesos clave en el avance de la enfermedad como son la inflamación y fibrosis renal, retroalimentándose todos los mecanismos entre sí. Tras observar la toxicidad del BPA, decidimos evaluar si el BPS era capaz de producir efectos similares a este. Los ensayos *in vitro* mostraron que, a concentraciones equivalentes, el BPS no produce efectos citotóxicos o incrementos en el estrés oxidativo o inflamatorio en células epiteliales del túbulo proximal renal humano. Por otro lado, se estudió el efecto de la hemodiálisis en las concentraciones plasmáticas de BPA y BPS en pacientes con ERC, en dos estudios de diseño cruzado, uno agudo (1 semana) y otro crónico (3 meses), utilizando diferentes dializadores según sus membranas: polisulfona (contiene BPA y BPS) y polinefrona (sin BPA, pero con BPS), donde después del período estimado en cada ensayo los pacientes cambiaron de dializador para evaluar los efectos de cada uno. Los niveles plasmáticos de BPA y BPS en los pacientes con ERC fueron muy superiores a los de la población sana, y los niveles de BPS fueron menores a los de BPA en ambos grupos. En relación a los ensayos agudo y crónico, no se observaron diferencias en las concentraciones de BPA y BPS en función del dializador, aunque los dializadores de polisulfona mostraron una mayor acumulación de BPA comparando los dos estudios, a diferencia de las concentraciones de BPS que se mantuvieron estables en ambos estudios y dializadores, indicando una acumulación de BPA en el organismo de los pacientes con el dializador polisulfona dependiente del tiempo.

Finalmente, la ingesta de probióticos (Vivomixx) durante 9 meses en pacientes con ERC en estadios III y IV provocó una mayor diversidad de la microbiota intestinal, mejorando el perfil de disbiosis intestinal previo en estos pacientes. Además, disminuyó el filo bacteriano *Bacteroidota*, uno de los responsables de la producción de diversos metabolitos urémicos. Por otro lado, después del tratamiento con probióticos, no se produjeron incrementos en las toxinas urémicas, hecho que se puede asociar a un enlentecimiento en la progresión de la enfermedad.

Chronic Kidney Disease (CKD) is a multifactorial disease. There are several factors that contribute to the progression of this pathology, such as uremic toxins, which may be increased in CKD patients as a consequence, for example, of intestinal dysbiosis. On the other hand, there are ubiquitous environmental molecules that can be toxic to CKD patients, especially to those in more advanced stages. Among these molecules, bisphenol A (BPA) stands out, which accumulates in the body of these patients due to its renal elimination. Currently, the industry has alternatives to this molecule, such as bisphenol S (BPS), which, despite being structurally similar to BPA, is more heat stable. However, studies of the possible effects of BPS in humans are scarce, especially in CKD. In vitro and in vivo studies on exposure to BPA confirm that this molecule is capable of accelerating the progression of kidney disease through increased oxidative stress and blocking autophagic flow, thus favoring key processes in the progression of the disease such as inflammation and renal fibrosis, all the mechanisms feeding back each other. Once known BPA toxicity, we decided to evaluate whether BPS was capable of producing similar effects. In vitro tests showed that, at equivalent concentrations, BPS does not produce cytotoxic effects or increases in oxidative or inflammatory stress in epithelial cells of the human renal proximal tubule. On the other hand, the effect of hemodialysis on plasma concentrations of BPA and BPS in patients with CKD was studied in two crossover design studies, one acute (1 week) and the other chronic (3 months), using different dialyzers according to their membranes: polysulfone (contains BPA and BPS) and polynephron (without BPA, but with BPS), where after the estimated period in each trial the patients changed dialyzer to evaluate the effects of each. The plasma levels of BPA and BPS in the CKD patients were higher than those of the healthy population, and the levels of BPS were lower than those of BPA in both groups. In relation to the acute and chronic tests, no differences were observed in the concentrations of BPA and BPS depending on the dialyser, although the polysulfone dialyzers showed a greater accumulation of BPA when comparing the two studies, unlike the concentrations of BPS that were remained stable in both studies and dialyzers, indicating a time-dependent accumulation of BPA in the body of patients with the polysulfone dialyser.

Finally, the intake of probiotics (Vivomixx) for 9 months in patients with CKD in stages III and IV caused a greater diversity of the intestinal microbiota, improving the profile of previous intestinal dysbiosis in these patients. In addition, the bacterial phylum *Bacteroidota*, one of those responsible to produce various uremic metabolites, decreased. On the other hand, after treatment with probiotics, there were no increases in uremic toxins, a fact that can be associated with a slowdown in the progression of the disease.

# INTRODUCCIÓN

---

# 1. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

## 1.1. Enfermedad renal crónica: definición y situación actual

La enfermedad renal crónica (ERC), independientemente de la etiología, se ha convertido en uno de los principales problemas de la salud pública en los últimos años.<sup>1,2</sup> La relevancia sanitaria se centra principalmente en dos aspectos. En primer lugar, los tratamientos sustitutivos de la ERC, ya sea diálisis o trasplante renal, constituyen un 5% del presupuesto de los sistemas sanitarios, siendo uno de los tratamientos más costosos en cuanto a enfermedades crónicas se refiere.<sup>2</sup> Además, en la actualidad existe un incremento en los pacientes que terminan desarrollando enfermedad renal crónica terminal (ERCT),<sup>3</sup> requiriendo alguna de las terapias sustitutivas. Por otro lado, la ERC produce, desde estadios iniciales, un incremento significativo del riesgo de morbilidad cardiovascular y mortalidad total, tanto en población normal como en los grupos de riesgo de enfermedad cardiovascular, afectando a gran parte de la población.<sup>1,4</sup>

La recopilación de datos a nivel mundial ha establecido que cerca de 500 millones de adultos padecen ERC,<sup>5</sup> existiendo un gran número de pacientes con enfermedad renal oculta (no diagnosticada). En EE. UU. se ha estimado que se duplicarán los casos de ERC en una década,<sup>6</sup> mientras que en la UE se ha detectado un incremento anual aproximado del 5%.<sup>7</sup> En España, según datos del estudio EPIRCE (Epidemiología Insuficiencia Renal Crónica en España), se estima que el 10% de la población adulta sufrirá algún grado de ERC, situándose el 6,8% entre los estadios III y V, y afectando a más del 20% de los mayores de 60 años. La prevalencia se incrementa por el envejecimiento de la población, y el incremento de la prevalencia de sus factores de riesgo, como enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión u obesidad, puede alcanzar el 35-40%.<sup>3,8,9</sup>

### 1.1.1. Definición

La ERC en el adulto se define como la presencia de una alteración estructural o funcional renal, o un filtrado glomerular (FG) inferior a 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> que persiste durante al menos 3 meses o más.<sup>2,10</sup> En las guías KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) también se incluyen como ERC a los pacientes trasplantados renales independientemente del grado de lesión renal que presentasen.

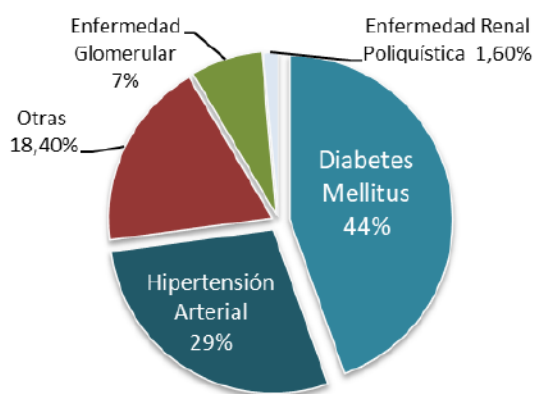
Las lesiones renales pueden diagnosticarse a través de métodos directos, como alteraciones histológicas en la biopsia renal, o de forma indirecta mediante marcadores como la albuminuria, alteraciones en el sedimento urinario o técnicas de imagen. Las guías KDIGO reúnen los criterios clínicos para la clasificación pronóstica de la ERC basada en los estadios de FG y albuminuria (Tabla 1).



**Tabla 1. Clasificación de la ERC según las guías KDIGO 2012.** Verde: riesgo bajo (si no hay otro marcador de enfermedad renal, no es ERC); amarillo: riesgo moderadamente incrementado; naranja: riesgo elevado; rojo: riesgo muy elevado. Modificado de KDIGO 2013.

Clasificación de la ERC según las guías KDIGO			Albuminuria		
			A1	A2	A3
			Normal a ligeramente elevada	Moderadamente elevada	Gravemente elevada
Filtrado glomerular Rangos (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )			< 30 mg/g <sup>a</sup> < 3 mg/mmol	30-300 mg/g <sup>a</sup> 3-30 mg/mmol	> 300 mg/g <sup>a</sup> > 30 mg/mmol
<b>G1</b>	Normal o elevado	≥ 90			
<b>G2</b>	Ligeramente disminuido	60-89			
<b>G3a</b>	Ligera-moderadamente disminuido	45-59			
<b>G3b</b>	Moderada-gravemente disminuido	30-44			
<b>G4</b>	Gravemente disminuido	15-29			
<b>G5</b>	Fallo renal	< 15			

La ERC se considera el tramo final común de una serie de alteraciones que afectan al riñón de forma irreversible y crónica. Existen diferentes factores que pueden dar origen a un fallo renal, como son los de origen inmunológico (nefropatía por IgA, nefritis lúpica), de origen hemodinámico (hipertensión), isquemias, nefrotóxicos o infecciones bacterianas, pero la principal causa de enfermedad renal es la diabetes mellitus tipo 2 (Figura 1).<sup>3, 7, 11</sup> Otro de los factores causantes de la progresión del daño renal son la obesidad y el envejecimiento.<sup>12, 13</sup>



**Figura 1. Representación porcentual de las causas más comunes de ERC.** Diabetes mellitus (44%): principalmente de tipo 2; Hipertensión arterial (29%): segunda causa de insuficiencia renal; Otras (18,4%): abuso de medicamentos, enfermedades del sistema inmunológico (VIH, SIDA), lupus, cáncer e infecciones graves; Enfermedad glomerular (7%): produce daño en los vasos sanguíneos que filtran la sangre en los riñones; Enfermedad renal poliquística (1,6%): produce acumulación de quistes en el riñón que deriva en ERC.

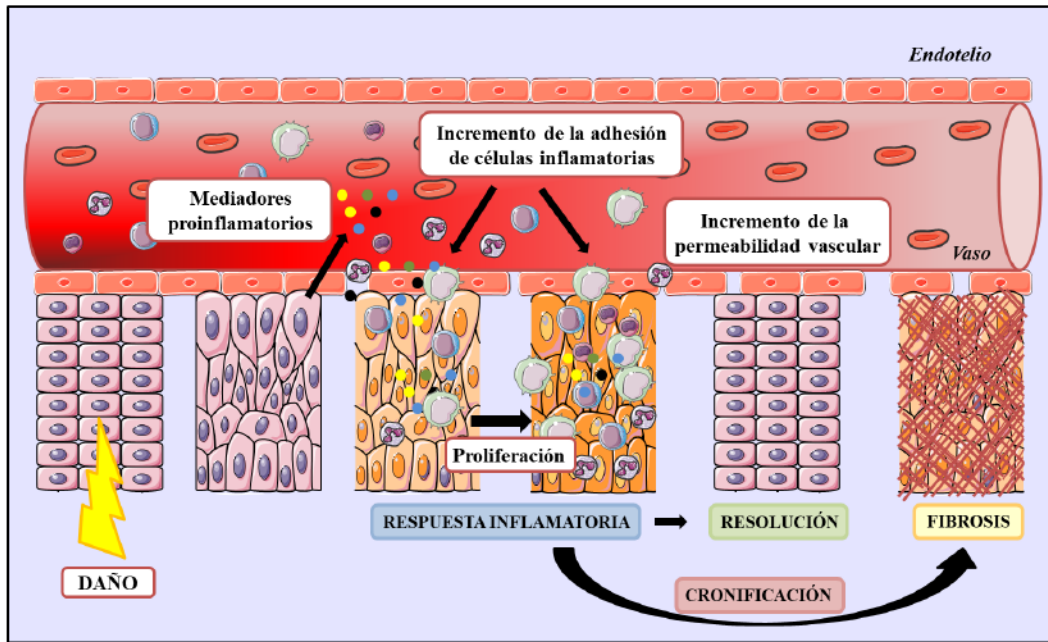
La ERC se caracteriza por la destrucción de forma progresiva del parénquima renal y la pérdida funcional de las nefronas,<sup>14</sup> que en última instancia conducen a la ERCT con la necesidad de seguir uno de los tres tipos de tratamiento sustitutivo renal: hemodiálisis (HD), diálisis peritoneal (DP) o trasplante renal (Tx).

Uno de los principales problemas es la falta de biomarcadores predictivos para su uso clínico que podrían predecir e informar del avance de la ERC hacia la etapa terminal,<sup>15</sup> retrasando el diagnóstico en muchos de estos pacientes. En cuanto a los tratamientos actuales para la enfermedad renal, como el uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECA), antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA II), o bloqueadores del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAA)<sup>16, 17</sup> en patologías renales derivadas de la diabetes o hipertensión, solo ralentizan el avance de la enfermedad.

## 1.2. Mecanismos responsables de daño renal

### 1.2.1. Proceso inflamatorio

La inflamación es un proceso complejo producto de diferentes estímulos que pueden ser inmunológicos o no inmunológicos y cuya función principal es la de reparación del daño y restauración de la función del tejido, intentando así producir el menor daño tisular posible.<sup>18</sup> El proceso de inflamación renal puede producirse como consecuencia de un daño agudo o como parte de un proceso sistémico y global. Dicho proceso se inicia con una vasodilatación e incremento del flujo sanguíneo, así como con el incremento de la permeabilidad vascular y el reclutamiento de células inflamatorias a la zona de tejido dañado.<sup>19, 20</sup> Una vez en el tejido, las células inflamatorias del sistema inmune encargadas de la reparación del daño son capaces de adherirse al vaso e integrarse en el tejido dañado a través de un proceso en el que intervienen diferentes mediadores proinflamatorios, como las moléculas de adhesión, selectinas, integrinas y quimioquinas.<sup>21</sup> En un ambiente proinflamatorio, las células tubulointersticiales secretan citoquinas proinflamatorias, como IL-6, TNF- $\alpha$ , TWEAK, IL-1 $\beta$ , quimioquinas, como CCL2 y CCL5, factores de crecimiento, como TGF- $\beta$ , CTGF, moléculas de adhesión, como ICAM-1, y péptidos vasoactivos, como Ang-II.<sup>22, 23</sup> Durante el proceso de daño renal se produce la activación de cascadas de señalización, como NF- $\kappa$ B, encargadas de la transcripción de genes implicados en la inflamación.<sup>24, 25</sup> Si el organismo no es capaz de restaurar el daño, se produce un proceso fibrótico, caracterizado principalmente por fibrosis tubulointersticial, atrofia tubular y esclerosis glomerular (Figura 2).<sup>20, 26</sup>



**Figura 2.** Representación esquemática del proceso inflamatorio y su evolución hacia la fibrosis o hacia la resolución del daño.

### 1.2.2. Proceso fibrótico

La fibrosis forma parte del proceso de reparación normal que se genera en respuesta a una lesión y preserva la arquitectura e integridad funcional del tejido.<sup>27</sup> Sin embargo, la desregulación de este proceso o la presencia de estímulos de forma crónica como procesos de inflamación y el estrés oxidativo producen la alteración del proceso normal de reparación, desembocando en acumulación de proteínas de matriz extracelular (MEC), principalmente componentes profibróticos como fibronectina y colágeno tipo I, III y IV.<sup>28, 29</sup>

En la patología renal el proceso fibrogénico está mediado por células infiltrantes del sistema inmune, células del túbulo epitelial y fibroblastos intersticiales, siendo estos los que sintetizan la mayor parte de la MEC.<sup>30</sup> El proceso se inicia en la fase inflamatoria mediante la activación de las células del túbulo epitelial o las células mononucleares infiltrantes que producen un aumento del número de miofibroblastos intersticiales, lo que conlleva un incremento en el depósito de componentes de la MEC, cuyo proceso es reversible. Sin embargo, en condiciones patológicas las células del túbulo epitelial y endoteliales pueden sufrir transición epitelio/mesénquima (TEM), dando lugar a miofibroblastos productores de matriz (TEM) y contribuir a la fibrosis renal y progresión de la enfermedad.<sup>31</sup> Además, la pérdida de podocitos y su reemplazo por MEC, la lesión de células tubulares y la posterior fibrosis tubulointersticial contribuye a la pérdida de nefronas en la ERC.<sup>32 33 34</sup> Todos estos procesos desembocan en el reemplazo del parénquima renal por MEC, produciéndose un daño irreversible. Por tanto, independientemente de la etiología, la ERC progresa a fibrosis tubulointersticial que se

correlaciona fuertemente con la proteinuria.<sup>35</sup> En todo este proceso participan diferentes factores, destacando CTGF, TGF- $\beta$ , FGF, Ang-II.<sup>28, 36-38</sup>

Uno de los principales mediadores clásicos claves para el proceso fibrótico es el TGF- $\beta$ . Este regulador se expresa en tres isoformas diferentes, TGF- $\beta$ 1, 2 y 3, siendo la primera isoforma la más abundante. Una vez la isoforma 1 está activada, se une al receptor tipo II de TGF- $\beta$  (T $\beta$ RII), quinasa que recluta al receptor tipo I de TGF- $\beta$  (T $\beta$ RI), y a su vez fosforila a los receptores asociados a proteínas SMAD (R-SMAD), SMAD2 y SMAD3.<sup>39</sup> Una vez fosforiladas, SMAD2 y SMAD3 se unen a la subunidad más común de SMAD, SMAD4, translocándose al núcleo y promoviendo la transcripción de diferentes genes con la ayuda de diferentes coactivadores y represores. En dicho proceso, la subunidad SMAD7 compite de forma activa con R-SMAD por unirse a los receptores activos, actuando así como un inhibidor competitivo.<sup>40</sup> Hay evidencias que demuestran que TGF- $\beta$ 1 es uno de los principales mediadores en la ERC asociado a fibrosis renal progresiva y además posee otras propiedades fisiológicas, entre las que destaca la proliferación celular, apoptosis, diferenciación celular, autofagia y producción de MEC.<sup>41</sup> Diferentes estudios han demostrado como TGF- $\beta$ 1 está sustancialmente regulado en riñones dañados en pacientes con ERC, así como en diferentes modelos animales de daño renal.<sup>42, 43</sup>

### 1.2.3. Proceso de estrés oxidativo

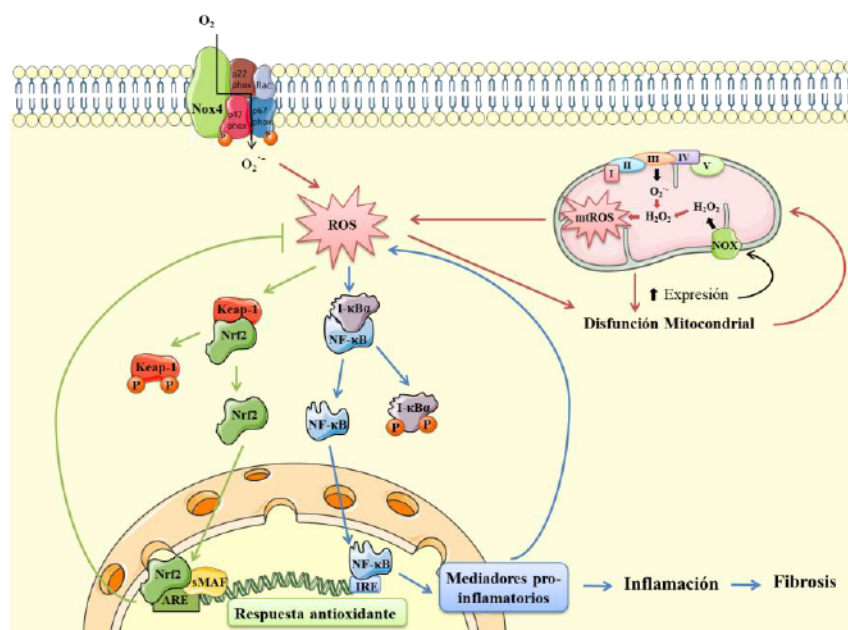
El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o especies reactivas de nitrógeno (RNS), y la capacidad antioxidante celular para reparar el daño producido, que desemboca en niveles elevados de ROS/RNS.<sup>44</sup> Las ROS son subproductos del metabolismo aeróbico como, por ejemplo, del anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los radicales hidroxilos ( $OH^\cdot$ ). Actualmente las ROS son consideradas mensajeros secundarios importantes en la señalización celular, ya que bajos niveles son necesarios para la señalización de supervivencia, proliferación celular, crecimiento y metabolismo energético.<sup>45-47</sup> Sin embargo, la acumulación excesiva de ROS conduce a procesos inflamatorios, daño celular y, en última instancia, muerte celular, ya que pueden reaccionar con lípidos, proteínas y ADN generando dicho daño.<sup>47</sup> Por lo tanto, las células mantienen una estricta homeostasis redox, entre la producción y eliminación de ROS.

El organismo posee sistemas de protección para mantener la homeostasis redox, evitando la generación excesiva de ROS, o reparando los daños producidos por estos.<sup>48</sup> El  $O_2^-$  es altamente reactivo, se genera a través de la reducción del oxígeno mediante diversas enzimas oxidasas y la cadena de transporte de electrones mitocondrial.<sup>49</sup> El  $O_2^-$  es convertido a  $H_2O_2$  mediante la acción de la superóxido dismutasa (SOD), una de las enzimas claves en la desintoxicación celular y altamente expresada en los riñones, o por la acción de la familia nicotinamida adenina



dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa.<sup>50, 51</sup> Así, la acumulación de  $O_2^-$  se asocia principalmente con el estrés oxidativo, por su naturaleza radical y reactiva, mientras que el  $H_2O_2$  se relaciona con la regulación de la función celular, ya que produce la oxidación reversible de tioles de los residuos de cisteína reactivos.<sup>52</sup> Otro de los sensores claves para el mantenimiento del equilibrio redox es el factor de transcripción Nrf2, que regula la expresión inducida de múltiples genes que codifican enzimas detoxifiantes y antioxidantes entre los que destacan la hemoxigenasa-1 (HO-1), NAD(P)H quinona oxireductasa (NQO1) y enzimas implicadas en la síntesis y utilización de glutatión (glutatión transferasa, ligasa, peroxidasa...), mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE (de sus siglas en inglés *Antioxidant Response Element*).<sup>53</sup>

El riñón es un órgano con un metabolismo muy activo, en el que se produce una gran cantidad de reacciones de oxidación en las mitocondrias, haciéndolo vulnerable al daño causado por el estrés oxidativo.<sup>54</sup> Diferentes procesos celulares pueden ser una fuente de estrés oxidativo en pacientes con ERC, como la función mitocondrial deteriorada, el incremento de ROS citoplasmático<sup>55</sup> o la inflamación, ya que marcadores como IL-6, TNF- $\alpha$  o el fibrinógeno pueden inducir estrés oxidativo a través de varias vías de señalización.<sup>56, 57</sup> Por otro lado, el estrés oxidativo puede empeorar la inflamación por la activación de NF- $\kappa$ B, produciéndose un incremento en la activación y reclutamiento de las células inmunes,<sup>58, 59</sup> estableciéndose así un feedback positivo entre estos dos fenómenos. De esta manera, las citoquinas inflamatorias asociadas con el estrés oxidativo promueven el daño en los tejidos renales al inducir apoptosis, necrosis y fibrosis,<sup>59, 60</sup> teniendo un papel relevante en la patogénesis y progresión de la ERC (Figura 3).



**Figura 3.** Procesos implicados en el estrés oxidativo en la enfermedad renal crónica.

Finalmente, el daño causado por el estrés oxidativo se agrava aún más en pacientes que requieren terapia de diálisis debido a la biocompatibilidad de las membranas de diálisis en HD o soluciones de DP.<sup>61, 62</sup>

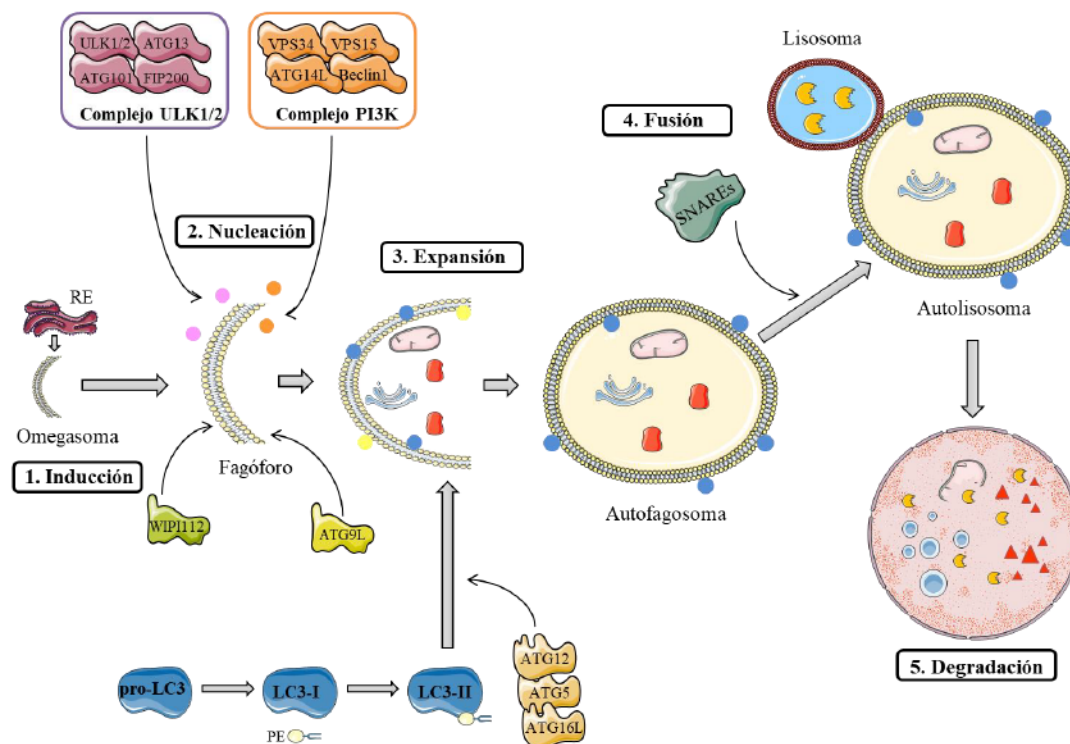
#### 1.2.4. Proceso autofágico

La homeostasis celular se mantiene en un equilibrio entre los procesos catabólicos y anabólicos celulares. Uno de los procesos encargados de dicho equilibrio es la autofagia, definida como una vía de degradación lisosómica de componentes citoplasmáticos.<sup>63</sup> Sin embargo, no solo se encarga de la eliminación de componentes citoplasmáticos, orgánulos potencialmente disfuncionales o proteínas dañadas, sino que otorga un sistema dinámico celular que produce nuevos sustratos y energía para la renovación y la homeostasis celular.<sup>64-66</sup> Por lo tanto, la autofagia participa en procesos de crecimiento celular, desarrollo, supervivencia y muerte, razón por la cual su desregulación está relacionada en patologías como cáncer, enfermedades neurodegenerativas, cardíacas o renales.<sup>67</sup> Dependiendo de los componentes a degradar y de la ruta de entrega de la carga al lisosoma, se puede clasificar como macroautofagia, microautofagia o autofagia mediada por chaperonas. La macroautofagia se caracteriza por usar un tipo intermediario de orgánulo denominado autofagosoma. Actualmente, se acepta que este es el principal tipo de autofagia celular.<sup>64</sup>

La autofagia es un proceso con múltiples pasos en los cuales están involucrados la inducción, nucleación, expansión, fusión y degradación.<sup>68</sup> Durante la biogénesis del autofagosoma participan de forma coordinada varios complejos de proteínas relacionadas con la autofagia (ATG) con los componentes de tráfico de membrana. La inducción de la autofagia se inicia mediante la disociación del complejo mTORC1 (del inglés *mammalian target of rapamycin complex 1*), regulador negativo de la vía, produciéndose así la activación del complejo formado por las proteínas quinasas de serina/treonina ULK1 y ULK2, junto con otras proteínas como Atg13, Atg101 y FIP20.<sup>69, 70</sup> A continuación, se inicia el proceso de nucleación de la vesícula y formación del fagóforo mediante la activación del complejo de la 3-quinasa de clase III (PI3K), formado por VSP34 y Beclin, que en condiciones basales se encuentra inhibido por la familia de proteínas antiapoptóticas BCL-2.<sup>71, 72</sup> Después, dos sistemas de conjugación del tipo ubiquitina (Ub), y la proteína asociada a microtúbulos 1 de cadena ligera 3 (LC3) controlan la expansión y finalización del autofagosoma.<sup>73</sup> Al finalizar la formación del autofagosoma, proteínas del citoesqueleto y motoras relacionadas con esta vía se encargan del movimiento del autofagosoma para su fusión con el lisosoma (contiene hidrolasas ácidas para la descomposición del material de desecho), dicha fusión está controlada por el receptor soluble de la proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida (SNARE),<sup>74</sup> formándose así el autolisosoma (Figura 4). La autofagia puede ser también un proceso selectivo debido a la participación de proteínas como LC3 y su



unión a proteínas adaptadoras como p62/SQSTM1, mediante las regiones LIR (región de interacción de LC3) y su unión a sustratos ubiquitinados.<sup>75</sup>



**Figura 4.** Esquema representativo del proceso autofágico.

En los últimos años, se ha investigado la implicación de la autofagia en las enfermedades renales, tanto en las afecciones agudas como crónicas. En modelos animales de daño renal, como la obstrucción unilateral del uréter (UUO), se ha observado el efecto protector de la autofagia mediante el uso de animales con deficiencia en proteínas claves de esta vía, incrementándose procesos fibróticos renales al estar bloqueada.<sup>76</sup> Además, en células túbulo epiteliales renales la autofagia regula la expresión de TGF- $\beta$ , al promover la degradación de dicho factor.<sup>76</sup> En el mismo estudio, en animales con delección de LC3 o Beclin se observó un incremento de TGF- $\beta$  maduro, asociado a fibrosis más severa y apoptosis en los riñones obstruidos después del modelo UUO.<sup>76</sup>

### 1.3. Características clínicas del paciente con enfermedad renal crónica

Durante las fases iniciales de la ERC, los pacientes suelen presentar estados asintomáticos. Una vez el FG disminuye por debajo de 30 ml/min, pueden aparecer los primeros síntomas como astenia o malestar general. Los síntomas que pueden presentar estos pacientes son manifestaciones cardiovasculares,<sup>77</sup> como hipertensión arterial, alteraciones gastrointestinales, hematológicas,<sup>78</sup> neurológicas (causadas por la acumulación de toxinas urémicas),<sup>79</sup>

osteomusculares,<sup>80</sup> dermatológicas y hormonales, estas últimas afectando principalmente el tiroides y, en consecuencia, la parathormona (PTH).<sup>81</sup>

Las alteraciones bioquímicas producidas en el paciente con ERC son múltiples. Principalmente se producen alteraciones hidroelectrolíticas de sodio, potasio y de equilibrio ácido base. Otras de las alteraciones características afectan al metabolismo mineral, como calcio, fósforo, vitamina D y PTH.

Adicionalmente, también pueden aparecer alteraciones asociadas a dislipemia, como elevados niveles de colesterol, LDL, colesterol total y triglicéridos, así como HDL bajo, que incrementan la morbilidad y la mortalidad de la patología. La alteración más común es la hipertrigliceridemia. También se ha relacionado la dislipemia como factor acelerador de la progresión de la enfermedad renal, por incremento en la expresión de citoquinas inflamatorias, síntesis de matriz extracelular y oxidación del LDL, incrementando el estrés oxidativo en el organismo.<sup>82</sup>

#### **1.4. Técnicas de hemodiálisis**

Durante los últimos 30 años, el número de pacientes sometidos a diálisis de mantenimiento en todo el mundo ha aumentado drásticamente.<sup>83</sup> En 2010 se calculó que el número de enfermos en diálisis era más de 2 millones en todo el mundo, y cálculos basados en modelos matemáticos sugieren que será el doble en 2030.<sup>84</sup> Diferentes factores han contribuido a dicho aumento, como es la mejora de la supervivencia de la población general, la reducción en la mortalidad de pacientes en diálisis, el incremento en la incidencia de la ERC y el mayor acceso a diálisis en países con ingresos bajos o medios.<sup>83, 85</sup>

Una vez alcanzados los estadios finales de la enfermedad renal, al haber fracasado los tratamientos conservadores en el paciente, se procede a la sustitución temporal o definitiva de la función renal mediante la depuración extracorpórea o el trasplante renal. La diálisis suple parcialmente las funciones renales al excretar agua y la mayoría de los solutos desechables, y de regular el equilibrio ácido-básico y electrolítico. Sin embargo, la diálisis no es capaz de suplir las funciones endocrinas ni metabólicas del riñón. Esta técnica consiste en interponer entre dos compartimentos líquidos (sangre y líquido de diálisis) una membrana semipermeable, que permite el paso del agua y solutos de pequeño y mediano peso molecular, pero no de proteínas o células sanguíneas, demasiado grandes para atravesar los poros de la membrana. Existen dos mecanismos físicos implicados: la difusión o transporte por conducción pasiva y la ultrafiltración o transporte por convección.<sup>86</sup> Existen diferentes tipos de diálisis, entre los que podemos destacar la hemodiálisis (HD), diálisis peritoneal (DP) y hemofiltración (HF).

#### 1.4.1. Material usado en hemodiálisis

Durante la hemodiálisis existen diferentes componentes del proceso que entran en contacto con la sangre del paciente y es importante saber cuáles son:

##### Filtro o dializador

La parte imprescindible del sistema de depuración con hemodiálisis es el dializador, donde se genera la eliminación de las toxinas urémicas retenidas y producidas en el paciente con ERC.<sup>87</sup> El dializador contiene una membrana semipermeable que separa dos compartimentos, uno por el que circula la sangre y otro por el que circula el líquido de diálisis, todo ello envuelto en una carcasa de recubrimiento. Podemos encontrar diferentes tipos de dializador en función de su diseño geométrico, composición de la membrana o capacidad para eliminar solutos de la sangre.<sup>88</sup> En cuanto al desarrollo de los dializadores, continuamente se están introduciendo ciertas modificaciones estructurales, ya sea en la entrada de sangre como en la del líquido de diálisis, enfocadas ambas a incrementar la eficiencia depuradora.<sup>89</sup>

La parte más importante del dializador es la membrana de diálisis. Los tipos de membranas se pueden clasificar en función de su composición química (celulósicas, celulósicas modificadas o sintéticas) o de acuerdo a sus características y propiedades que le otorgan su capacidad de depuración.<sup>88</sup> En este sentido, se han clasificado en función de su grado de permeabilidad, biocompatibilidad, eficacia depuradora, distribución simétrica o asimétrica (según distribución y tamaño de los poros), polaridad y propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas (Tabla 2).<sup>90</sup>

**Tabla 2. Clasificación de las membranas de diálisis.**

<i>Composición del material</i>		
<i>Celulósicas</i>	Celulosa no modificada (low-flux)	Ej: Acetato de celulosa
	Celulosa modificada (low-flux)	Ej: Hemofan
	Celulosa modificada (high-flux)	Ej: Triacetato de celulosa
<i>Sintéticas</i>	Baja permeabilidad (low-flux)	Ej: Policarbonato, polisulfona LF
	Alta permeabilidad (high-flux)	Ej: Polisulfona, PMMA, poliamida
<i>Permeabilidad</i>		
<i>Coefficiente de UF: KUf ml/min/mmHg</i>	Alta > 20 ml/hora/mmHg	
	Intermedia 12-20 ml/hora/mmHg	
	Baja < 10-12 ml/hora/mmHg	

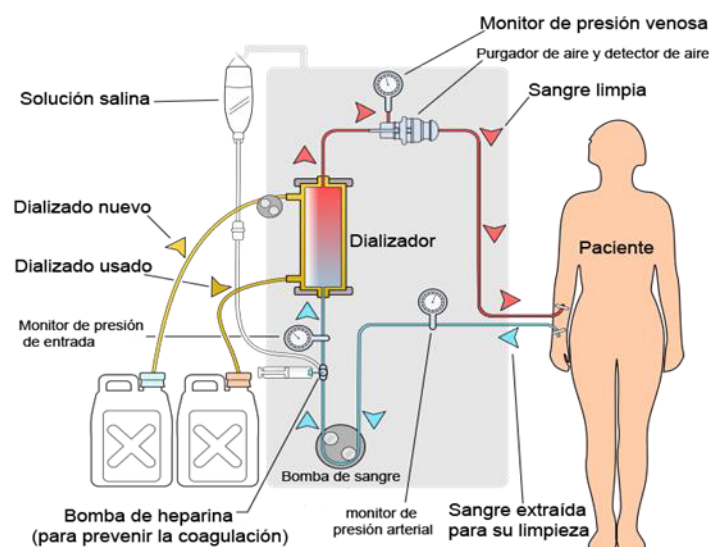
Externamente el dializador está cubierto por una carcasa de material plástico, en el interior del cual se encuentran los capilares de las membranas y el líquido de diálisis. El material de la carcasa suele ser policarbonato, aunque también existen de polipropileno, poliuretano o triacetato de celulosa.

### Líquido de diálisis

El líquido de diálisis está compuesto por agua ultrapura, bicarbonato y un conjunto de electrolitos denominado concentrado de diálisis. La mezcla de todos los componentes la realiza el monitor de diálisis. Una vez preparada, esta mezcla es trasladada al dializador para ponerse en contacto con la sangre del paciente mediante la membrana de diálisis comentada anteriormente. El líquido de reposición es utilizado para reponer todo o la mayor parte del líquido perdido a causa del ultrafiltrado, dicho fluido perdido contiene los productos de desecho que se eliminarían por el riñón. La composición de ambos líquidos es muy similar a la del plasma.

### Líneas arterial y venosa

El circuito extracorpóreo está formado por una línea arterial conectada al paciente en diálisis, y a través de una bomba se impulsa la sangre hacia el dializador. A continuación, la sangre circula por la membrana del dializador, donde se realiza el intercambio de sustancias con el líquido de diálisis. La sangre que sale del dializador sale depurada y retorna al paciente por la línea venosa. Durante el trayecto de ambas líneas hay puntos para la extracción de sangre o administración de medicación, así como cámaras para la estabilización de la sangre. Las dos líneas actualmente están fabricadas en PVC (Figura 5).



**Figura 5. Representación gráfica del circuito de diálisis**



#### *1.4.2. Principios físicos en hemodiálisis*

En relación con los mecanismos físicos implicados en la diálisis citados anteriormente, estos son clave para la correcta eliminación de las sustancias tóxicas. El transporte por difusión consiste en un transporte pasivo de los solutos mediante la membrana del dializador, produciéndose por la diferencia de concentración entre ambos compartimentos, en uno la sangre del paciente y en el otro el líquido de diálisis. Todo el proceso es dinámico, puesto que la sangre no deja de circular por el dializador, entrando de la línea arterial con impurezas (toxinas) y retornando al paciente por la línea venosa sin dichas impurezas. Del mismo modo ocurre con el líquido de diálisis, entra al dializador puro y sale del dializador con las impurezas, por lo tanto, en el dializador siempre existe la diferencia de concentraciones para poder realizar el transporte por difusión.<sup>86</sup>

Por otro lado, el transporte por convección o ultrafiltración consiste en el paso simultáneo a través de la membrana del dializador del solvente (agua plasmática) y los solutos que pueden atravesar los poros de la membrana mediante el efecto de un gradiente de presión hidrostática. El líquido extraído de la sangre a través de la membrana por este mecanismo recibe el nombre de ultrafiltrado. La función es eliminar el líquido de exceso generado durante las sesiones de diálisis, ya que podría provocar un incremento en la presión arterial y aumento del ritmo cardíaco ocasionando complicaciones en los pacientes.<sup>86</sup>

#### *1.4.3. Tipos de técnicas en hemodiálisis*

La difusión y convección son los dos principales principios físicos que regulan la depuración de sustancias en la diálisis extracorpórea. Es importante tener en cuenta que las moléculas de pequeño tamaño y gran movilidad se eliminan bien por difusión, sin embargo, las de tamaño mediano y grande y de poca movilidad se depuran mejor por convección. Existe otro fenómeno importante para la eliminación de las toxinas urémicas unidas a proteína, ya que estas se depuran con dificultad por convección, y se eliminan mejor mediante la adsorción de estas a la membrana de diálisis, pero la capacidad de adsorción de los dializadores es muy limitada. En cuanto a los diferentes tipos de técnicas de diálisis utilizadas se clasifican en dos grandes grupos según predomine el principio de difusión (HD) o de convección (técnica convectiva).<sup>91</sup>

##### *1.4.3.1. Hemodiálisis*

Este tipo de diálisis era el procedimiento de depuración extracorpórea más utilizado en el tratamiento de la insuficiencia renal crónica. La hemodiálisis es una técnica fundamentalmente difusiva, la convección solo es utilizada para eliminar el agua retenida durante el periodo de interdialis. Los aspectos que regulan la difusión de los pequeños solutos son la superficie del dializador, el flujo de sangre y el flujo del baño de diálisis. En cuanto a la eliminación de las

moléculas medianas y grandes, es menos eficaz y depende principalmente de la permeabilidad de la membrana. Hay varias modalidades en función de la permeabilidad, eficiencia y biocompatibilidad del dializador utilizado. La eficiencia del dializador es la capacidad de eliminación de pequeñas moléculas y se determina mediante el coeficiente de transferencia de masas para la urea (KoA). El KoA es el aclaramiento máximo teórico de un dializador, con un flujo infinito de sangre y líquido de diálisis. En función del KoA del dializador, la hemodiálisis se puede clasificar como baja ( $KoA < 500$  ml/min), moderada ( $KoA = 500-700$ ) o alta eficiencia ( $KoA > 700$  ml/min).<sup>92</sup>

#### 1.4.3.2. Técnicas convectivas

Este tipo de técnica surge con la finalidad de incrementar la eliminación de las moléculas de mediano y gran tamaño, puesto que por difusión se eliminan mal. En la convección la transferencia de solutos se realiza mediante arrastre por flujo en el cual entra en juego el tamaño del poro y la tasa de ultrafiltración. Todas las membranas de las técnicas convectivas utilizan membranas biocompatibles y se debe reponer el exceso de volumen extraído mediante un líquido de reposición de composición fisiológica. Las técnicas convectivas pueden utilizar únicamente el principio de convección sin difusión (HF), o combinar el principio de difusión con diversas formas de convección (hemodiafiltración, HDF). A su vez, también se pueden clasificar según el líquido de sustitución sea de electrolitos contenidos en bolsas (convección clásica) o el propio baño de diálisis tratado previamente (convección "on-line").

- **Hemofiltración:** la depuración de las moléculas se produce exclusivamente por el principio de convección. Para que la diálisis sea efectiva, según los criterios basados en la eliminación de urea, se debe conseguir un volumen convectivo equivalente a su volumen de distribución (un mínimo de 30 litros). El elevado volumen de líquido de reposición hizo que esta técnica tuviera escaso desarrollo.<sup>91</sup>
- **Hemodiafiltración:** combina los dos principios, el de difusión y convección. Mediante flujos arteriales menores y la tasa de ultrafiltración de hasta 12 litros por sesión, esta técnica es capaz de conseguir aclaramientos de pequeñas moléculas muy superior al de hemofiltración, y eliminación de medianas y grandes moléculas intermedia entre hemodiálisis y hemofiltración. Dentro de este tipo de diálisis cabe destacar la hemodiafiltración "on-line" (HDF OL), ya que ofrece la posibilidad de utilizar como líquido de sustitución el baño de diálisis conforme se va produciendo en el monitor, sin almacenamiento externo. Dicho líquido debe ser fabricado con agua de gran pureza, estando en continua recirculación, y antes de entrar al circuito sanguíneo del paciente debe pasar por filtros de endotoxinas en el circuito de diálisis. La hemodiafiltración "on-line" es la principal técnica convectiva utilizada actualmente.<sup>91</sup>



## 1.5. Toxinas urémicas

### 1.5.1. Definición y clasificación

La pérdida progresiva de la función renal en la ERC está acompañada por la retención progresiva de una gran cantidad de metabolitos que en condiciones normales son excretados por el riñón.<sup>93</sup> Se ha demostrado que muchos de estos compuestos pueden ejercer a las concentraciones observadas en estos pacientes actividad biológica, produciendo alteraciones en la homeostasis de las células y órganos, lo que resulta en el síndrome urémico.<sup>94</sup> Los solutos responsables de dicho síndrome son las denominadas toxinas urémicas.

Las toxinas urémicas se han clasificado en tres grupos: solutos pequeños e hidrosolubles, moléculas medianas y solutos unidos a proteínas (Tabla 3).<sup>93</sup>

**Tabla 3. Clasificación toxinas urémicas:** ADMA, dimetilarginina asimétrica; SDMA, dimetilarginina simétrica; TMAO, trimetilamina-N-óxido; ANP, péptido natriurético atrial; FGF23, factor de crecimiento fibroblástico 23; PTH, hormona paratiroidea; TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral; AGEs, productos finales de glicación avanzada. Adaptada de Hideki Fuji y col.<sup>95</sup>

		Compuestos unidos a proteínas (Principalmente < 500Da)
ADMA	ANP	AGEs
	$\beta_2$ -microglobulina	
	Endotelina	
	FGF23	
	Ghrelin	
	Ig de cadena ligera	
	IL-6	
	IL-8	
	IL-18	
	Lípidos y lipoproteínas	
	Neuropéptido Y	
	PTH	
	Retinol unido a proteína	
	TNF- $\alpha$	

Los solutos de pequeño tamaño, como la urea o creatinina, son fáciles de eliminar mediante cualquier técnica de diálisis, aunque ciertos compuestos ofrecen mayor resistencia debido a sus características cinéticas.<sup>96</sup>

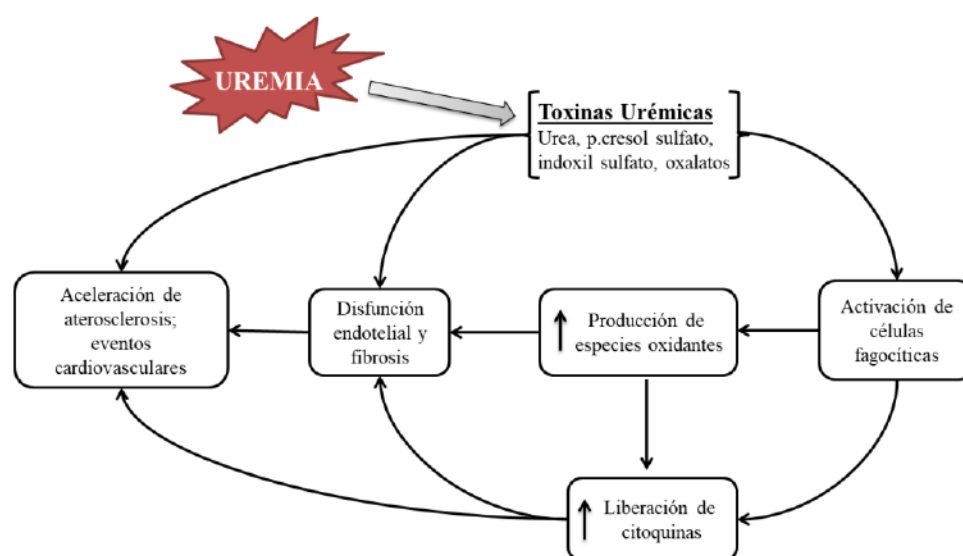
Con respecto a las moléculas de tamaño medio, estas son principalmente pequeñas proteínas o péptidos que en condiciones normales pueden atravesar la barrera de filtración glomerular (< 58.000 Da). Su peso molecular mínimo se ha fijado en 500 Da, aunque la mayoría de las moléculas de este grupo tienen un peso molecular mayor a 10.000 Da. Este grupo contiene tanto moléculas intactas como productos de su degradación.<sup>97</sup> En contraste con las moléculas de

los otros grupos, la mayoría de estas son generadas endógenamente y en muchos de los casos forman parte de mecanismos homeostáticos para compensar los cambios producidos por las toxinas urémicas o la propia enfermedad (por ejemplo, PTH o citoquinas). Debido a su tamaño, su eliminación en diálisis solo es posible con membranas con un tamaño del poro grande (membranas de alto flujo), que se pueden utilizar tanto en hemodiálisis como en hemodiafiltración.<sup>98</sup>

Finalmente, las toxinas urémicas unidas a proteínas son un grupo heterogéneo generalmente formado por moléculas pequeñas, que debido a su unión a proteínas son difíciles de eliminar por diálisis. Su coeficiente de unión a proteínas es en general bajo, aunque ciertos compuestos pueden ser más estables, en especial aquellos generados por modificaciones postraduccionales, como los productos finales de glicación avanzada (AGEs). El origen de muchos de los solutos unidos a proteínas es intestinal.<sup>99</sup>

### 1.5.2. Importancia clínica y daño celular

El síndrome urémico, producido en parte por la acumulación de las toxinas urémicas, constituye una asociación compleja de anomalías bioquímicas y fisiopatológicas, que conduce al incremento de la morbilidad y mortalidad de la ERC.<sup>100, 101</sup> Los daños producidos por estas moléculas son mayoritariamente daño cardiovascular, inflamación, estrés oxidativo y fibrosis, los cuales participan de forma directa sobre la progresión de la enfermedad renal (Figura 6).<sup>102, 103</sup> Los principales productos de retención en el síndrome urémico son: urea, creatinina, pseudouridina,<sup>104</sup> diferentes guanidinas, indoxil sulfato (IS), ácido orto-hipúrico,<sup>105, 106</sup> algunos péptidos,<sup>107</sup> PTH,  $\beta_2$ -microglobulina, purinas, fenoles e indoles (p-cresol sulfato (pCS), ácido fenil acético), fosfatos la dimetilarginina<sup>108</sup> y oxalatos.<sup>109</sup>

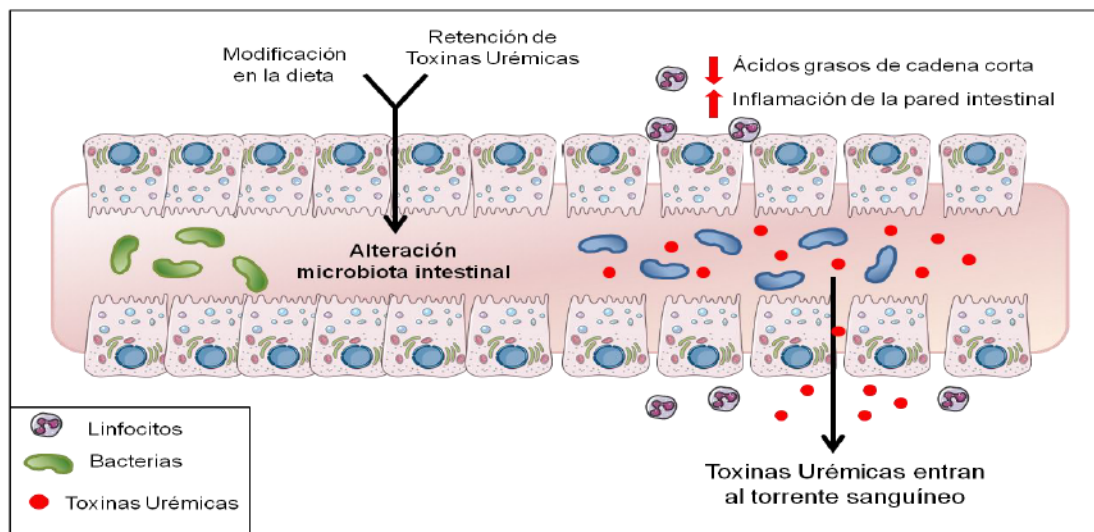


**Figura 6. Esquema del daño causado por la uremia en el organismo.**

### 1.5.3. Microbiota y toxinas urémicas

El cuerpo humano alberga aproximadamente 100 billones de bacterias en el intestino que reciben el nombre de microbiota intestinal.<sup>110</sup> Las bacterias del intestino conviven en simbiosis con el resto del organismo, colaborando en diversas funciones como, por ejemplo, el sistema inmune, facilitar la absorción de nutrientes o degradación de la fibra dietética.<sup>111, 112</sup> Las principales especies bacterianas presentes en el intestino pertenecen a los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*.<sup>113, 114</sup>

Existen diversas evidencias tanto experimentales como clínicas derivadas de estudios genómicos y no genómicos, en los cuales se observa cómo la microbiota intestinal de los pacientes con ERC se encuentra alterada, es decir, presentan una composición anormal de esta.<sup>115, 116</sup> Ante estas anomalías, existen múltiples sucesos patológicos entre la microbiota alterada y la progresión de la enfermedad. Entre todos ellos destacan el incremento en la permeabilidad del intestino, la sobreproducción de toxinas urémicas generadas por la microbiota (pCS, IS, ácido 3 indolacético (IAA) y la trimetilamina N-óxido (TMAO),<sup>117</sup> disminución de los niveles de moléculas con efecto nefroprotector (butirato o vitamina K) y cambios en la dieta.<sup>118</sup> Adicionalmente, en algunos estudios recogidos en la literatura se observa un incremento de especies bacterianas propensas a la fermentación proteolítica, como *Clostridium* o *Bacteriodes*, y/o disminución de bacterias propensas a incrementar moléculas potencialmente nefroprotectoras (ácidos grasos de cadena corta), como los *Lactobacillus* (Figura 7).<sup>119</sup>



**Figura 7. Alteración de la microbiota en la ERC, incremento de las toxinas urémicas en el organismo.** El ambiente intestinal es alterado por la modificación en la dieta de los pacientes con ERC (baja en fibra, potasio, fósforo) y la mayor retención de toxinas urémicas. La alteración de la microbiota está asociada con una inflamación de la pared intestinal, pérdida de las uniones entre enterocitos, disminución de los ácidos grasos de cadena corta y generación en el intestino de los precursores de toxinas urémicas, como indoxil sulfato o p-cresol sulfato. Estas toxinas son translocadas al torrente sanguíneo y contribuyen a la progresión de la enfermedad.

El p-cresol es sintetizado a partir de los aminoácidos tirosina y fenilalanina procedentes de la dieta por bacterias intestinales anaeróbicas, y sulfatado (o conjugado a grupos sulfato) por el hígado (pCS) o glucuronado por los enterocitos (pCG), secretándose por la orina, pero acumulándose en los pacientes con ERC entre los estadios I-V.<sup>120</sup> Los niveles medios de pCS en pacientes con ERC entre los estadios I-V son 50  $\mu\text{M}$  y 0,22  $\mu\text{M}$  para el pCG, aunque se pueden llegar a incrementar hasta 500  $\mu\text{M}$  y 8  $\mu\text{M}$ , respectivamente, en pacientes en estadios finales.<sup>102</sup> El pCS se ha asociado y puede contribuir a la mortalidad, la enfermedad cardiovascular y la progresión de la ERC.<sup>121</sup> También se ha observado que en células del túbulo proximal renal, el pCS produce citotoxicidad, estrés oxidativo y un estado proinflamatorio y profibrótico.<sup>122,123, 124</sup>

Otra de las toxinas urémicas incrementadas por la modificación de la microbiota es el IS. El IS es una molécula pequeña unida a proteína, procedente de la conversión del triptófano de la dieta en indol en bacterias por la acción de triptofanasas, y metabolizado por el hígado para formar el IS, y eliminado finalmente por los riñones, por lo tanto, acumulándose también en los pacientes con ERC.<sup>119, 123</sup> El IS contribuye a la progresión de la enfermedad renal y vascular,<sup>123</sup> y es capaz de generar un incremento del estrés oxidativo, inflamación y fibrosis en células renales.<sup>125</sup>

En los últimos años se han propuesto diversas estrategias para paliar los efectos de una microbiota intestinal anómala, mediante la introducción de dietas alternativas que restrinjan el uso de precursores de toxinas urémicas o a través de la utilización de absorbentes orales basados en carbon activado (AST-120) para disminuir la absorción de las toxinas urémicas, como los indoles.<sup>126</sup> Aunque en modelos animales esta última aproximación sí dio buenos resultados, los ensayos clínicos en humanos (EPPIC-1 y EPPIC-2) no mostraron beneficios en la progresión de la ERC. Otra de las estrategias para modular la producción de toxinas urémicas es el uso de prebióticos, probióticos o simbióticos<sup>117</sup> con el objetivo de restaurar una microbiota intestinal más fisiológica o nefroprotectora.

#### *1.5.4. Estrategias para la disminución de toxinas urémicas*

Para la depuración de las toxinas urémicas en pacientes con ERC en estadio terminal, la principal estrategia es la diálisis, concretamente la HD de bajo flujo que elimina moléculas cuyo tamaño es  $< 5.000$  Da. En general, las moléculas pequeñas, como la urea o la creatinina, se eliminan mediante difusión, es decir, se dializan bien con cualquier técnica o membrana, mientras que las moléculas de mayor tamaño se dializan mejor con transporte convectivo o por ultrafiltración.

La hemodiafiltración con elevados volúmenes de reposición es la técnica que elimina más eficazmente las toxinas con independencia de su tamaño. Sin embargo, en la actualidad no hay técnicas eficaces para la adecuada eliminación de moléculas unidas a proteínas.



Por otro lado, para los pacientes en diferentes estadios incluidos también los del estadio final, existen pocas opciones terapéuticas que sean capaces de disminuir específicamente la concentración de estos solutos, especialmente los unidos a proteínas.

Como se ha comentado previamente, una de las estrategias sería la administración de AST-120 para disminuir la absorción de las toxinas urémicas en el intestino, pero los ensayos clínicos no mostraron beneficios en la progresión de la enfermedad.<sup>127</sup>

Por lo tanto, en vista de la naturaleza multifactorial de la uremia y la complejidad de los diferentes solutos que la producen, las estrategias deberían centrarse en disminuir la concentración de los grupos de solutos y no meramente en la disminución de uno solo de ellos para mejorar la progresión del daño en la ERC.

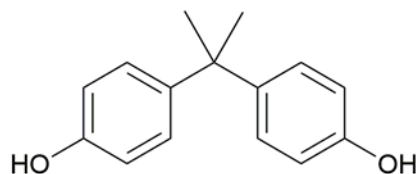
## **2. TOXINAS URÉMICAS EXÓGENAS SINTÉTICAS: BISFENOLES**

### **2.1. BISFENOL A**

#### *2.1.1. Historia y aplicación industrial*

El impacto de las sustancias químicas ambientales en la salud pública y el bienestar se ha estudiado y reconocido desde hace mucho tiempo, con un enfoque principal en los metales pesados y las moléculas producidas en el lugar de trabajo.<sup>128</sup> Sin embargo, cada vez hay más investigaciones que indican que la población general está expuesta inconscientemente a una gran variedad de productos químicos como consecuencia de las actividades cotidianas del consumidor. Dentro de estas actividades encontramos la ingesta de alimentos, preparación de alimentos domésticos y comerciales, limpieza del hogar, atención médica y dental de rutina.<sup>129-131</sup>

El bisfenol A (BPA) es un producto químico sintético industrial formado por dos grupos funcionales fenólicos unidos por un puente de metilo (Figura 8).<sup>132</sup> La síntesis del BPA se realizó con el objetivo de ser un estrógeno sintético,<sup>132</sup> pero fue sustituido por el dietilestilbestrol. En la actualidad, gracias a las propiedades fisicoquímicas del BPA, este es utilizado en la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epoxi. De este modo, el BPA forma parte de los materiales de almacenamiento de alimentos, como utensilios de microondas, botellas de agua, materiales dentales, etc.<sup>130, 133, 134</sup> Otro de los usos, pero menos frecuente, es en la fabricación del papel reciclado y térmico. Al estar presente en la mayoría de los envases alimenticios, el BPA se ha convertido en un compuesto ambiental ubicuo detectable en la orina de más del 93% de los adultos, ya que la exposición puede realizarse a través de la ingestión, la respiración y absorción a través de la piel.<sup>135</sup>



**Figura 8. Estructura química del bisfenol A.**

### 2.1.2. Metabolismo

Los estudios en animales han confirmado la absorción rápida y eficiente del BPA a través de la mucosa oral, en especial después de una exposición sublingual.<sup>136</sup> Esta ruta de entrada mediante la saliva, que evita el aclaramiento hepático de primer paso, podría generar una mayor exposición al BPA de lo que se puede explicar únicamente sobre la base de absorción del tracto gastrointestinal.<sup>136</sup> Estas rutas se han estudiado en animales de experimentación y no han sido confirmada en humanos.<sup>137</sup> En humanos, el BPA libre es metabolizado en el intestino e hígado a través de conjugación rápida con grupos glucurónicos o sulfatos y es eliminado por los riñones.<sup>138, 139</sup> En base a modelos farmacocinéticos, la reabsorción tubular renal de los conjugados de BPA podría contribuir a los niveles séricos de BPA detectados en humanos,<sup>140</sup> pero todavía no hay estudios sobre la contribución del daño renal del BPA mediante esta vía.

Existen otras rutas que podrían influir en la tasa de eliminación del BPA por el riñón,<sup>141, 142</sup> como son la recirculación enterohepática y el almacenamiento de lípidos, los cuales podrían explicar las diferencias entre los niveles medidos de BPA en suero humano y los pronosticados por datos farmacocinéticos.<sup>143</sup> Otra ruta minoritaria del metabolismo del BPA es la oxidación por hidroxilación a un catecol seguida por la transformación a una o-quinolona.<sup>138, 144</sup>

### 2.1.3. BPA y vías de señalización celular

El BPA, al haber sido sintetizado como prototipo de estrógeno no esteroideo, es capaz de unirse y activar los receptores estrogénicos  $\alpha$  y  $\beta$  (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ).<sup>145</sup> Se ha podido demostrar su unión a estos receptores, produciendo alteraciones en su localización y modulando actividades de transcripción, a pesar de tener menor afinidad que el estradiol.<sup>146</sup> Como consecuencia de su baja afinidad por estos receptores, el BPA no ejerce su acción molecular únicamente por su interacción con estos. Diversos estudios revelan que es capaz de activar la vía no clásica de los receptores de estrógeno, como los receptores asociados a proteínas G (GPER) o el receptor  $\gamma$  relacionado con estrógeno (ERR $\gamma$ ), así como su activación del receptor de la hormona tiroidea y del receptor de andrógenos.<sup>147, 148</sup> Este carácter estrogénico ha sido foco de numerosos estudios y existe un evidencia creciente de que el BPA altera la reproducción, el desarrollo, el metabolismo y la respuesta inmune.<sup>148-151</sup>



Además, el BPA es capaz de inducir la formación de ROS mediante la actividad enzimática ( $\text{H}_2\text{O}_2$ /peroxidasa o NADPH/CYP450) y no enzimática (peroxinitrito/ $\text{CO}_2$  y  $^-\text{OCl}/\text{HOCl}$ ).<sup>152, 153</sup> Las posteriores reacciones de estos radicales con NADPH o glutatión intracelular (GSH) junto con un procesamiento enzimático adicional producen una gran variedad de especies de radicales, como superóxidos, peróxidos y radicales hidroxilo, produciendo un desequilibrio homeostático celular.<sup>152, 153</sup>

Por otra parte, hay estudios que demuestran que dosis de rango nanomolar y micromolar de BPA se acumulan en la mitocondria e induciendo disfunción mitocondrial a través del desacoplamiento de la membrana mitocondrial.<sup>154, 155</sup> Adicionalmente, se ha observado que el BPA es capaz de disminuir la actividad enzimática de los complejos I, II, III, IV y V de la cadena de transporte electrónico<sup>156</sup> y producir un incremento de ROS mitocondrial, en especial del anión superóxido.<sup>157</sup>

Por último, el BPA es capaz de influir en la inflamación y la respuesta inmunitaria a través de varias vías de señalización y alteración de diversas células inmunitarias, como los linfocitos  $\text{CD4}^+$ , los linfocitos B y macrófagos.<sup>158</sup> Esta respuesta inflamatoria está causada principalmente por la familia de las MAPKs y factores de transcripción NF- $\kappa\text{B}$  y la familia STAT.<sup>158</sup>

#### 2.1.4. Evidencias en humanos

Los estudios observacionales en humanos sobre la acción del BPA en el organismo han sido muy diversos. En estudios epidemiológicos se han observado correlaciones positivas entre los niveles de BPA y algunas enfermedades humanas, revelando la gran necesidad de aumentar el número de estudios que confirmen este vínculo.<sup>151, 159</sup>

Parece ser que la exposición al BPA podría también afectar a la salud reproductiva humana, así como ocurre en modelos animales. Datos epidemiológicos muestran que la exposición a BPA está asociada a una disminución de la calidad del semen, los niveles libres de testosterona, el índice de andrógenos libres y el aumento de los niveles de globulina transportadora de hormonas sexuales.<sup>160, 161</sup> Además, se ha observado que pequeñas exposiciones a BPA son capaces de producir defectos o trastornos congénitos y desórdenes en el desarrollo,<sup>162</sup> ya que el feto se expone rápidamente cuando la madre ingiere BPA al disponer de menor capacidad para metabolizarlo,<sup>163, 164</sup> observándose efectos adversos que incluyen un menor peso en el nacimiento y expresión de adipocinas.<sup>165</sup>

En cuanto a la exposición del BPA y los diferentes tipos de cáncer, existen pocos estudios epidemiológicos hasta la fecha. Sin embargo, sí se han observado asociaciones entre los niveles de BPA y el riesgo de padecer cáncer de mama, y según la Academia Nacional de Medicina de

Estados Unidos, el BPA es considerado un factor de riesgo potencial para el cáncer de mama,<sup>166</sup> apoyándose también en estudios *in vitro* que mostraron que el BPA puede acelerar la tumorigénesis mamaria y la metástasis en ratones MMTV-erbB2.<sup>167</sup>

Por otra parte, estudios experimentales han sugerido que el BPA modifica el metabolismo de la glucosa mediante diversos mecanismos que afectan a la resistencia a la insulina, disfunción de las células beta del páncreas, adipogénesis e inflamación, lo que supone una conexión plausible entre el BPA y la diabetes.<sup>168-170</sup> Se ha observado que una mayor exposición al BPA, reflejada en concentraciones urinarias mayores de BPA registradas en población adulta general en EE.UU., puede estar asociada con la diabetes.<sup>171</sup> También, se ha sugerido que la exposición al BPA puede ser un promotor de otros factores de riesgo de la diabetes como la obesidad, al alterar parte de los circuitos neuronales que regulan la conducta alimentaria o alterar la diferenciación de adipocitos.<sup>172</sup> De hecho, se ha informado una correlación entre el BPA urinario y la obesidad en población adulta general de EE.UU.<sup>173</sup>

Finalmente, en los últimos años se han publicado diferentes estudios que relacionan la enfermedad cardiovascular y la exposición a BPA, informando de un importante riesgo predictivo de enfermedad arterial coronaria tanto en hombres como en mujeres aparentemente sanos.<sup>174</sup> En otros estudios, se informó que las concentraciones urinarias de BPA se asociaron con alteraciones cardiovasculares por sexo y edad.<sup>171</sup> No obstante, en la actualidad se necesitan más estudios para determinar las verdaderas relaciones dosis-respuesta y los mecanismos de acción sobre los cuales actúa el BPA.

#### 2.1.5. Bisfenol A en la enfermedad renal

##### 2.1.5.1. Bisfenol A como causante de daño renal

El BPA, como se ha expuesto anteriormente, es capaz de inducir diversos mecanismos celulares, como el estrés oxidativo y la inflamación. La principal vía de excreción del BPA es la urinaria, por lo tanto, el riñón es uno de los órganos que mayor exposición presenta a esta molécula. En un estudio de la NHANES-III, se observó que pacientes con una disminución de la excreción urinaria de BPA presentaban mayor deterioro en la función renal. Sin embargo, esto solo fue significativo en mujeres y cuando se utilizó la fórmula MDRD para estimar la tasa de filtrado glomerular.<sup>175</sup> En cuanto a estudios *in vitro*, nuestro grupo de investigación demostró que la exposición a BPA produce un incremento de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y apoptosis en células tubulares renales humanas.<sup>155</sup> Por otro lado, el BPA es capaz de reducir la viabilidad podocitaria y producir hipertrofia podocitaria mediante la acción de TGF- $\beta$  y la ciclina quinasa inhibidor p27Kip1.<sup>176</sup>

A pesar de todo ello, uno de los argumentos de las agencias gubernamentales para considerar seguro el uso del BPA en el consumo ordinario es la eliminación urinaria casi por completa de la molécula conjugada.<sup>177</sup> Sin embargo, el paciente con ERC debe considerarse población de riesgo en cuanto a la exposición del BPA, ya que su eliminación está alterada. Por este motivo, se necesitan más estudios sobre las posibles consecuencias de la acumulación de BPA en pacientes con ERC, cuyo estudio forma parte de esta tesis.

#### 2.1.5.2. Bisfenol A en diálisis

El paciente en diálisis está altamente expuesto a la toxicidad inducida por el BPA, ya que no puede eliminarlo por la orina al igual que el resto de toxinas urémicas. Además de la exposición ambiental a la que está expuesto el paciente, los sujetos en hemodiálisis también están en contacto con el BPA ya que esta molécula forma parte de la composición del material plástico de ciertos dializadores, en las carcasas de policarbonato o en diversas membranas de diálisis, como es el caso de la polisulfona (PS) o la "aleación poliéster-polímero".

El polímero de los dializadores que contiene BPA está en contacto con la sangre, lo que daría lugar a la liberación de este al torrente circulatorio. Diferentes estudios han descrito que los efluentes de los dializadores compuesto por BPA tienen concentraciones mayores de este.<sup>178</sup> Otros estudios analizaron diferentes tipos de dializadores de polisulfona, con diferente tipo de carcasa y esterilización con vapor de agua o rayos gamma, concluyendo que los dializadores de polisulfona con carcasa de policarbonato esterilizados con vapor de agua son los que mayor nivel de BPA liberan al efluente.<sup>179, 180</sup> Además, se ha observado como la migración del BPA de los dializadores al efluente es significativamente mayor cuando este es suero a cuando es salino.<sup>181</sup> En nuestro grupo pudimos observar en un estudio prospectivo y cruzado con pacientes en hemodiálisis convencional que la utilización de dializadores que contenían BPA (polisulfona, PS) presentaban niveles plasmáticos más elevados que aquellos pacientes sometidos a diálisis con dializadores libres de BPA (polinefrona, PN).<sup>182</sup>

En cuanto a los pacientes en DP, tan solo existe un estudio sobre el impacto del BPA, de tan solo 4 pacientes el cual concluye que el BPA no parece depurarse ni incrementarse en dicha técnica.<sup>183</sup>

A finales de 2015 se publicó un informe basado en la seguridad del uso del BPA en dispositivos médicos a cargo del comité experto del EU-SCENIHR, los cuales recomendaron la eliminación del BPA de los materiales médicos utilizados en neonatos en unidades de cuidados intensivos, niños sometidos a procedimientos prolongados y pacientes en diálisis.<sup>184</sup>

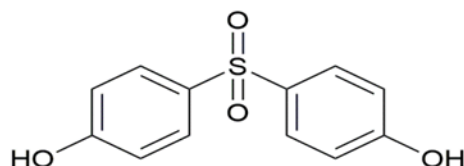


## 2.2. BISFENOL S COMO SUSTITUTO DEL BISFENOL A

Todos los datos y estudios expuestos acerca del BPA, llevaron a cabo diversas regulaciones sobre su producción y uso en EE.UU. y la UE.<sup>185</sup> En 2010, el gobierno canadiense prohibió la importación y venta de biberones que contuviesen BPA,<sup>186</sup> y en 2011 la UE también prohibió su empleo en el uso de materiales destinados a bebés.<sup>187</sup> Ante el incremento de la preocupación de la población sobre el BPA, las regulaciones gubernamentales se han empezado a endurecer y, en consecuencia, se han comenzado a producir sustancias alternativas para reemplazarlo a esta molécula.

En la actualidad se utilizan varios productos químicos que estructuralmente son similares al BPA para la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epoxi. Estos productos comparten una estructura común de dos anillos funcionales de hidroxifenilo y se denominan análogos de bisfenol.<sup>185</sup> En total se han documentado un total de 16 análogos de bisfenol para aplicaciones industriales, siendo los más utilizados el BPF, BPAF y BPS en la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epoxi.

El BPS, con una estructura química similar al BPA (Figura 9), contiene un grupo sulfona con elevada capacidad de absorción de electrones y dos grupos hidroxilo, por lo que, en términos de acidez, es más resistente que otros bisfenoles y presenta mayor estabilidad que el BPA.<sup>188</sup> Así, el BPS es más resistente al calor y a la radiación solar que el BPA, y su biodegradabilidad en agua de mar se clasificó como BPF > BPA > BPS.<sup>189</sup>



**Figura 9. Estructura química del bisfenol S.**

En cuanto a la exposición al BPS, esta se produce principalmente a través de la ingesta, inhalación o contacto dérmico, al igual que sucede con el BPA, pero las concentraciones urinarias son menores comparadas con este, probablemente debido a su menor uso en la industria.<sup>190</sup> En este sentido, cabe señalar que el BPS se utiliza como parte de la producción de plásticos de policarbonato y resinas epoxi, siendo su tasa anual de fabricación o importación de 10.000-100.000 toneladas en la UE,<sup>191</sup> mientras que la del BPA presenta una tasa anual de fabricación de 100.000-1.000.000 toneladas,<sup>192</sup> siendo así el más utilizado. Por otro lado, el conocimiento del metabolismo del BPS es escaso. Algunos ensayos *in vitro* e *in vivo* en ratones y peces cebra, han mostrado que el BPS sufre modificaciones metabólicas de fase II, obteniendo como resultado

BPS sulfato o glucuronato, y siendo la excreción mayoritaria la urinaria, al igual que ocurre con el BPA.<sup>193</sup> Cabe destacar que en muestras de orina humana ya se han detectado concentraciones de BPS, aunque los niveles son también significativamente menores que el BPA.<sup>194, 195</sup>

Como principal sustituto del BPA, el BPS se considera más seguro que este, aunque en parte esto puede deberse a la falta de datos suficientes para respaldar dicha afirmación, especialmente su toxicidad a exposiciones crónicas. Se ha observado que las concentraciones de BPS son menores que las de BPA en el medio ambiental,<sup>188, 196</sup> aunque con las constantes restricciones que ha sufrido y sufrirá el BPA, es cuestión de tiempo que estos niveles se incrementen.<sup>188</sup> Existen diferentes estudios en los cuales se han encontrado ciertas toxicidades del BPS mediante experimentos *in vitro*<sup>197</sup> e *in vivo* sugiriendo que tanto el BPS como sus metabolitos (sulfatado o glucuronizado) podrían actuar como disruptores endocrinos, de forma agonista al receptor estrogénico,<sup>188</sup> o con actividad antiandrogénica.<sup>198, 199</sup> Adicionalmente, la exposición a BPS se asoció a un incremento de estrés oxidativo en cultivo celular de hepatocitos y eritrocitos de rata.<sup>188, 197, 200</sup>

En la actualidad, la información sobre los efectos del BPS en humanos es escasa, por lo tanto, es necesario estudiar en profundidad las acciones de esta molécula y determinar una dosis de exposición diaria sugerida o dosis oral permitida de BPS para la exposición humana,<sup>188</sup> en especial para los pacientes con ERC.

# HIPÓTESIS

---



El BPA es una molécula ubicua en la sociedad que está presente en múltiples materiales de uso cotidiano y es capaz de actuar como disruptor endocrino en el organismo. En estudios previos del laboratorio, se han detectado valores séricos de BPA aumentados en pacientes con ERC, debido al uso de materiales clínicos con su presencia. En la actualidad, existe la tendencia de sustituir el BPA por el BPS, una molécula más estable químicamente, a pesar de que no hay evidencias disponibles sobre su posible efecto en el organismo y, especialmente, en el enfermo renal crónico. Por otro lado, las toxinas urémicas de origen intestinal incrementadas por la alteración de la microbiota en el paciente renal, también se han asociado con el desarrollo de complicaciones endocrinas y renales, promoviendo así el avance de la enfermedad.

En esta Tesis nos planteamos como **HIPÓTESIS PRINCIPAL** que el BPA, al igual que las toxinas urémicas, podría promover procesos adversos en la progresión de la ERC, y su sustitución del material de diálisis por BPS podría ser beneficiosa para estos pacientes. Asimismo, la reducción de estas toxinas urémicas mediante la administración de probióticos podría reducir los mecanismos responsables del daño renal a través de la mejora de la microbiota intestinal. Si nuestra hipótesis es correcta y el BPA está implicado en la progresión de la enfermedad renal, la sustitución de esta molécula por BPS en los pacientes renales en diálisis o el uso de probióticos en los pacientes renales en estadios previos a la diálisis, podrían suponer una potencial estrategia para reducir los mecanismos responsables de la progresión de la enfermedad renal.

# OBJETIVOS

---

El **OBJETIVO PRINCIPAL** de esta Tesis Doctoral es la evaluación del BPA como posible toxina urémica exógena y su comparación con el BPS como alternativa segura en el paciente renal en diálisis. Adicionalmente, se ha propuesto estudiar el efecto de la administración de probióticos en el paciente renal sobre los niveles de las toxinas urémicas producidas en esta patología y el estado de la microbiota intestinal. Con este fin, se plantean los siguientes **OBJETIVOS PARCIALES:**

1. Evaluación farmacológica del BPA en células epiteliales del túbulo proximal renal humano.
2. Estudio del efecto del BPA en un modelo animal de nefrectomía subtotal y su evaluación sobre la progresión de la ERC.
3. Evaluación farmacológica sobre el efecto del BPS en comparación al del BPA en células epiteliales del túbulo proximal renal humano.
4. Estudio de los niveles plasmáticos a corto y largo plazo del BPS frente al BPA, como alternativa segura a este, en pacientes con ERC terminal.
5. Evaluación del efecto de la modificación de la microbiota mediante la administración de probióticos sobre las toxinas urémicas en el paciente con ERC.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## **1. ENSAYOS CLÍNICOS EN PACIENTES EN DIÁLISIS**

Los ensayos clínicos en pacientes se plantearon como estudios cruzados con el objetivo de comparar los niveles plasmáticos de BPA frente a los niveles plasmáticos de BPS en pacientes en hemodiálisis, en función del tipo de dializador utilizado, usándose tanto membranas de polisulfona (PS) o membranas de polinefrona (PN), y del tiempo de utilización de dichas membranas. El estudio se aprobó por el Comité de Ética IIS-Fundación Jiménez Díaz. Los pacientes fueron reclutados después de dar su consentimiento informado por escrito. Para llevar a cabo dicho estudio se realizaron dos diseños experimentales diferentes: un estudio agudo, en el cual se evaluaron los efectos en una sola sesión de hemodiafiltración (HDF), y un estudio crónico, donde se evaluaron los efectos a largo plazo.

Para ambos estudios, todos los pacientes usaron los mismos monitores de diálisis (modelo 5008, Fresenius). Este modelo está equipado con dos ultrafiltros de polisulfona para filtrar agua ultrapura antes de que los monitores produzcan el líquido de diálisis. El material de la carcasa es polipropileno, mientras que el material de encapsulado es poliuretano. Antes del estudio, los pacientes se dializaron con membranas Elisio-21H (PN) o Fx80 (PS), que son las dos membranas disponibles habitualmente en nuestro centro para pacientes sin sospecha de reacciones de hipersensibilidad. En este último caso, se reemplazan por membranas de triacetato de celulosa.

Las muestras de individuos con función renal normal utilizadas como muestras control ( $n = 7$ ) se obtuvieron del banco de sangre previo consentimiento informado.

### **1.1. Población de estudio agudo**

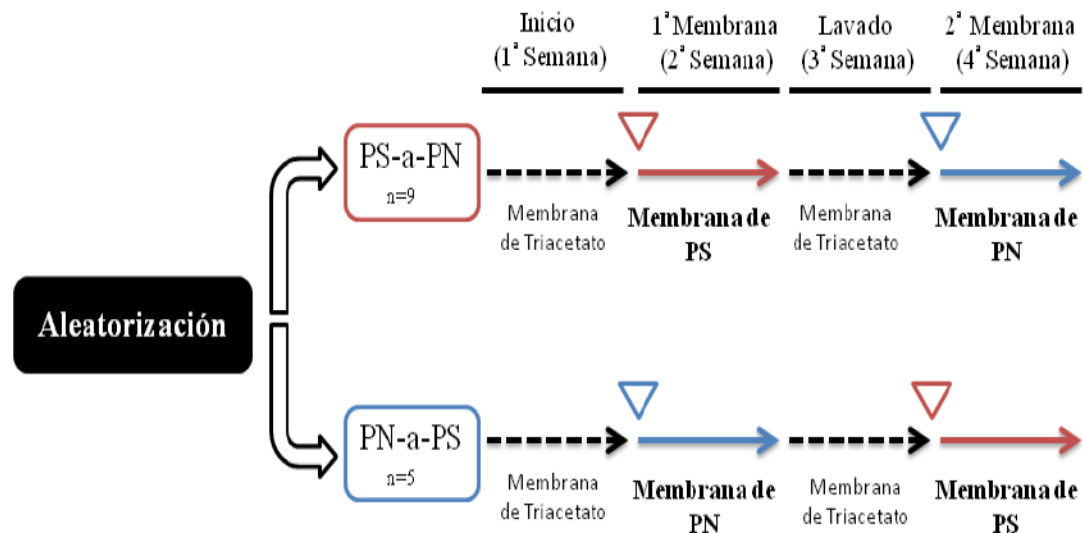
Los pacientes fueron reclutados después de dar su consentimiento informado por escrito, en el cual fueron reclutados un total de 14 pacientes con HDF. Para realizar el estudio se siguieron los siguientes criterios de inclusión: mayores de 18 años, con fístula arteriovenosa que garantiza flujos de al menos 350-400 ml/ml;  $Kt/v$  urea  $> 1,2$  y una diuresis inferior a 500 ml/día, así como ausencia de enfermedades inflamatorias, infecciosas u oncológicas activas en la iniciación o durante el estudio.

### **1.2. Diseño de estudio agudo**

Inicialmente, todos los pacientes fueron sometidos a un periodo de lavado de una semana, dializando con una membrana de triacetato de celulosa (3 sesiones). Después, en la siguiente sesión de diálisis, se dividieron a los pacientes de forma aleatoria, en función del tipo de membrana utilizada (membrana 1: PS o PN) extrayéndose muestra de sangre antes y después de la primera sesión de HDF con la membrana sintética correspondiente de cada paciente. Al



finalizar la semana de HDF con la misma membrana sintética (PS o PN), 3 sesiones de diálisis, se volvió a realizar un periodo de lavado mediante la membrana de triacetato de celulosa. Finalmente, la última semana se intercambiaron las membranas sintéticas en los pacientes, es decir, los pacientes que utilizaron PS se cambio por PN y de igual forma en el otro grupo. Nuevamente se extrajeron muestras de sangre antes y después de la diálisis. Se puede observar el diseño y las fases de intercambio y recogida de muestras en la Figura 10.



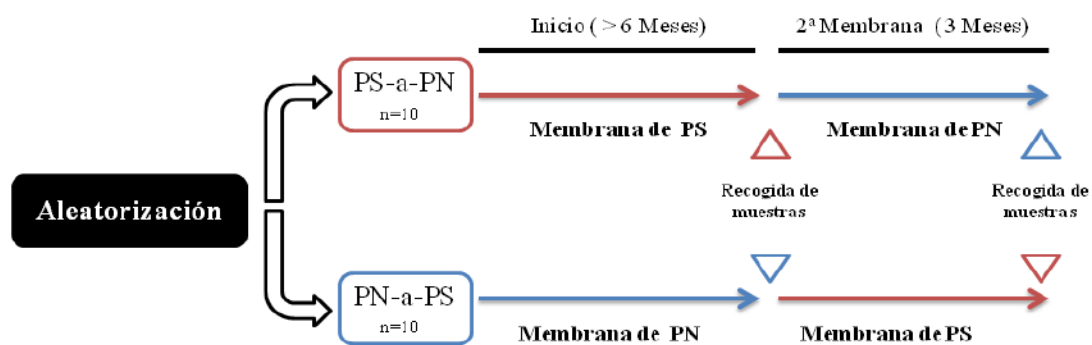
**Figura 10. Diseño experimental del estudio agudo.** Después de una semana con una membrana de control (triacetato de celulosa), se extrajo sangre antes y después de la diálisis durante la primera sesión con la membrana de estudio (polinefrona, PN o polisulfona, PS) para evaluar el impacto de las diferentes membranas en la concentración plasmática de los diferentes analitos. Después de una semana de lavado con la membrana de control, el estudio se repitió con la otra membrana (PN o PS).

### 1.3. Población de estudio crónico

Los pacientes de este estudio provienen de un estudio prospectivo cruzado de 9 meses previamente realizado, el cual solo difiere del anterior en el tiempo de estudio con cada tipo de membrana.<sup>201</sup> Previamente, bajo consentimiento informado, fueron seleccionados 10 pacientes de un brazo del estudio y otros 10 restantes del otro brazo (Figura 11). Para dicho estudio se realizaron los siguientes criterios de inclusión: mayores de 18 años, flujo sanguíneo > 300 ml/min y un flujo de dializado de 500 ml/min, utilizando fluidos de diálisis ultrapuros, definidos como < 0,1 UFC/ml y < 0,03 EU/ml. La duración de las sesiones de diálisis, composición de dializado y reinfusato (sodio 138-140 mmol/L, potasio 1,5-2,0 mmol/L, calcio 1,25-1,75 mmol/L, magnesio 0,5 mmol/L, cloruro 106-109 mmol/L, bicarbonato 34-37 mmol/L, acetato 3-4 mmol/L y glucosa 1 g/L) no fueron modificadas durante el estudio.

### 1.4. Diseño de estudio crónico

En primer lugar, los pacientes fueron asignados según la membrana presente en el inicio del estudio (membrana 1: PS o PN), en los cuales los pacientes siguieron con la misma membrana durante al menos 6 meses. Una vez transcurrido el tiempo necesario, se realizaron las extracciones de sangre al comienzo de la sesión de diálisis, para posteriormente realizar las diferentes determinaciones. A continuación, se les cambiaba la membrana sintética a los pacientes, dejando pasar un periodo de 3 meses con la membrana de cambio. Al finalizar dicho periodo se volvieron a recoger muestras de sangre para las determinaciones posteriores. Se puede observar el diseño y las fases de intercambio y recogida de muestras en la Figura 11.



**Figura 11. Diseño experimental del estudio crónico.** Solo se extrajo sangre antes de la diálisis después de al menos 6 meses con la membrana del estudio (PN o PS) y después de 3 meses de diálisis con la membrana alternativa (cambio de PS a PN y de PN a PS).

### 1.5. Técnica de diálisis

Para el desarrollo de esta tesis se ha analizado la presencia e influencia del BPA y BPS presente en los dializadores utilizados en los pacientes con insuficiencia renal crónica en tratamiento renal sustitutivo con las técnicas de HDF y hemodiafiltración en línea (HDF-OL). Mediante el estudio de estas dos técnicas se pretende determinar qué importancia tiene la membrana sintética del dializador en la transferencia de ambos analitos al paciente.

Para evitar interferencias procedentes de la función renal, los pacientes estudiados presentaban una diuresis inferior a 500 ml/día. De igual modo, se les informó en todo momento de los posibles productos que pueden contener trazas de BPA o BPS, pero en ningún momento se les modificó sus costumbres dietéticas.

Los pacientes participantes fueron finalmente en su totalidad reclutados en la unidad de Hemodiálisis del Hospital Universitario de Burgos (HUBU). El estudio fue aprobado por el Comité de Ensayos Clínicos de la Fundación Jiménez Díaz como centro coordinador del ensayo. Hay que destacar que el protocolo es considerado práctica clínica habitual y de intervención, dado

que no se modifican ni pautas de diálisis ni tratamiento (se trata de las 2 membranas utilizadas en dicha unidad). Conforme al criterio de inclusión, todos los participantes firmaron un consentimiento para participar en el estudio, previa información por parte del médico responsable

## 1.6. Dializadores

En ambos estudios, tanto en el agudo como en el crónico, se han usado dos tipos de dializadores, uno con presencia de BPA y BPS en la composición de la membrana y otro formado solo por BPS. En primer lugar, está el dializador FXClassix-80 (Fresenius, Bad Homburg, Alemania) con una membrana de helixona (polisulfona), constituida por un polímero que contiene BPA y BPS. En segundo lugar, el otro dializador utilizado fue ELISEO 21-H (Nipro Corp, Osaka, Japón), cuya membrana está compuesta de polinefrona (polietersulfona), es decir, sin BPA en su composición, pero sí con BPS. En ambos dializadores, el contenido de la carcasa está fabricado de polipropileno (material libre de BPA). Las especificaciones técnicas de cada dializador se detallan en la Tabla 4.

**Tabla 4. Especificaciones técnicas de los dializadores empleados en diálisis.**

<b>ACLARAMIENTO (Qf:0, QD:500 y QB:300) ml/min</b>									
Dializador	Superficie m²	Urea	Creati- nina	Vitamina B12	Inulina	Mioglobina	Fosfatos	Vol.de b ml/hr*mmHg	Coef.UC ml/mmHg/hr
<b>E21H</b>	1,9	280	268	95	127	101	215	115	76
<b>Fx80</b>	1,8	198	193	55	103	0,1	187	95	53

## 1.7. Monitores de diálisis

En ambos estudios se utilizaron los mismos monitores de diálisis, el modelo 5008 (Fresenius). Este modelo está equipado con dos ultrafiltros de polisulfona para filtrar el agua ultrapura antes de ser utilizada como líquido de diálisis. Por lo tanto, la posibilidad de que el líquido de diálisis presentase BPA o BPS es mínima, y al ser el mecanismo común en todos los pacientes, no se ha tenido en cuenta resos remanentes de dicha fuente. El material de la carcasa es polipropileno, mientras que el material del encapsulado es poliuretano. En cuanto a la duración de la diálisis, en ambos estudios fue superior a 3,5 horas, y no se ha tenido en cuenta el flujo de sangre, aunque siempre fue superior a 300 ml/min.

## 1.8. Obtención de muestras biológicas y preparación

Todas las muestras de sangre de los estudios provienen de pacientes en hemodiálisis en el HUBU, y fueron extraídas por el personal de enfermería antes del inicio y al final de las sesiones de diálisis correspondientes.

En cuanto al grupo control, las muestras se obtuvieron del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (HU-FJD) del Banco de Sangre. Previamente a la obtención de las muestras, se informó al paciente, se realizó un tratamiento de confidencialidad en los datos clínicos y se obtuvo la autorización previa a la realización del trabajo.

Todos los estudios están regidos bajo la normativa de la Declaración de Helsinki y fueron aprobados por los comités éticos correspondientes.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos EDTA estériles para la obtención del plasma (Venoject). Una vez recogidas, se mantuvieron los tubos a 4°C hasta proceder a la separación del plasma dentro de las 2 horas siguientes a la extracción. A continuación, se centrifuga entre 1.200-1.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, se recoge la parte superior del tubo, correspondiente al plasma, se alicuota y almacena a -80°C hasta su utilización.

### **1.9. Extracción de bisfenoles del plasma y determinación mediante espectrometría de masas**

Los productos químicos y reactivos utilizados en este estudio fueron el bisfenol A y el bisfenol S (Sigma-Aldrich).

En primer lugar, se realizó la extracción de bisfenoles (BPA y BPS) del plasma. Para ello, se cogieron 100 µL de plasma de cada paciente y se mezclaron con 500 µL de metanol. Seguidamente, se vortearon las muestras durante 1 minuto y después se centrifugaron a 6.000 rpm durante 5 minutos. A continuación, se cogieron 470 µL del sobrenadante y se dejó evaporar hasta sequedad en una centrifuga de concentrador modular (Thermo Scientific™ Sistemas SpeedVac™ digitales). Una vez evaporado todo el disolvente, se reconstituyó el precipitado en 100 µL de acetato amónico 1M pH 7 con 20% de metanol, y se añadieron 6 µL de glucuronidasa/sulfatasa (para determinar todo el BPA y BPS, tanto libre como conjugado) a 37°C durante la noche. Finalmente, se enfrió la mezcla para detener la reacción y se filtró con membranas de politetrafluoroetileno (PTFE, Sartorius Filtros, ThermoFisher Scientific).

Una vez realizada la extracción, se evaluaron las concentraciones plasmáticas de BPA, BPS y ácido hipúrico mediante cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) en un sistema Shimadzu de triple cuadrupolo LC-MS/MS (LCMS-8060; Shimadzu, Japón). Las condiciones para la evaluación combinada se optimizaron en las instalaciones de espectrometría de masas de la Universidad Complutense de Madrid, inyectando 10 µL de muestra en una columna de fase inversa (Phenomenex Gemini 5u C18 110A 150x2 mm, Torrance, CA, EE. UU.) y se utilizó un gradiente de agua/metanol a 0,3 ml/min para la separación de los analitos. Las transiciones observadas para BPA fueron 227,2 > 212,05 CE = +18V y 227,2



$> 133,10$  CE = + 25V; para BPS  $249,3 > 108,1$  CE = + 27V y  $249,3 > 92,05$  CE = + 35V; y para el ácido hipúrico  $178,0 > 134,1$  CE = + 18V y  $178,0 > 77,15$  CE = + 25V. Los límites de detección (LOD) fueron 0,05 ng/ml (ppb) para BPA y BPS, y 3 ng/ml (ppb) para el ácido hipúrico, mientras que los límites de cuantificación (LOQ) fueron 0,16 ng/ml (ppb) para BPA y BPS, y 10 ng/ml (ppb) para el ácido hipúrico.

### **1.10. Caracterización del contenido de BPS y BPA en fibras de los dializadores mediante Resonancia Magnética Nuclear**

Las fibras de los dializadores (Fx80 y ELISIO-21H) se caracterizaron mediante Resonancia Magnética Nuclear monodimensional de protón ( $^1\text{H}$ -RMN), de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN) y de carbono editado ( $^{13}\text{C}$ -RMN DEPT-135), y experimentos bidimensionales homo y heteronucleares ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC editado y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC) usando cloroformo y dimetilsulfóxido (DMSO) deuterado. Para las fibras procedentes del dializador Fx80, se disolvieron 8,0 mg en 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo deuterado y para las fibras del dializador ELISIO-21H, se disolvieron 7,4 mg en 500  $\mu\text{L}$  de DMSO deuterado y 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo deuterado. Los análisis se realizaron en un espectrómetro (Bruker Avance III HD 500 MHz) equipado con una sonda triple TBI  $^1\text{H}/^{31}\text{P}/\text{BB}$  indirecta, en el servicio de Espectrometría de la Universidad de Almería.

## **2. ENSAYOS CLÍNICOS EN PACIENTES RENALES EN ESTADIOS III-IV**

El ensayo clínico en pacientes renales en estadios III-IV se planteó como un estudio observacional multicéntrico y prospectivo con el objetivo de evaluar el efecto de la modificación de la microbiota en la generación de toxinas urémicas aromáticas, que son causantes de gran parte de las complicaciones de los pacientes renales en estadios avanzados, y observar así si se produce una mejora en la progresión de la ERC. El estudio se aprobó por el Comité de Ética IIS-Fundación Jiménez Díaz. Todos los pacientes fueron reclutados después de dar su consentimiento informado por escrito.

Vivomixx es un complemento alimenticio que ayuda a mantener el equilibrio de la flora intestinal mediante la combinación de diversas bacterias lácticas y bifidobacterias. Además, es el probiótico con la mayor concentración de bacterias beneficiosas para el organismo (450 mil millones de bacterias por sobre), con una combinación de 8 cepas bacterianas que actúan de forma sinérgica. Este producto ha sido utilizado en numerosos estudios relacionados principalmente con la enfermedad inflamatoria intestinal, pacientes oncológicos, diabetes, etc. En todos ellos, ha demostrado una eficacia en mayor o menor grado con la mejoría de la sintomatología digestiva, sin presentar reacciones adversas graves.



## **2.1. Población de estudio**

Los pacientes fueron reclutados de los hospitales HU-FJD (Madrid), Hospital da Costa de Burela (Lugo) y Hospital de Palamós (Girona), después de dar su consentimiento informado por escrito. Cada sujeto del estudio tendrá en posesión un documento escrito denominado "Hoja de información al paciente", en el que se referirá, de forma detallada, el objetivo y la descripción del estudio, los procedimientos del estudio, la duración prevista y el número de sujetos participantes, los beneficios y riesgos posibles derivados de su participación en el mismo y la confidencialidad de los datos de carácter personal.

En total fueron reclutados 25 pacientes. Los criterios de inclusión de los pacientes fueron: pacientes con ERC en estadios III-IV con FG medido mediante la ecuación CKD-EPI, mayores de 18 años, estables clínicamente durante al menos 3 meses y a los que se haya recomendado suplementación dietética con un probiótico.

## **2.2. Diseño de estudio**

Inicialmente, los pacientes fueron seleccionados en la visita basal (mes 0), en las que se les realizó una extracción de sangre con analítica general y otra extracción para determinación de las toxinas urémicas y una muestra de heces para el análisis de la microbiota. Los siguientes tres meses fueron de control, ya que el tratamiento con probiótico se inició a partir del mes 3. Ese día también se les realizó el test de calidad de vida EQ-5D-5L.

A partir del mes 3, se inició una intervención facilitándoles el suplemento alimenticio probiótico (Vivomixx). La dosis de probiótico fue de 1 sobre al día, pero si el paciente tuvo que realizar un tratamiento antibiótico se le indicó duplicar la dosis a 2 sobres al día durante ese período y en la próxima visita se registraron los días de seguimiento que ha estado en tratamiento con antibiótico desde el último control.

En total se realizarán las visitas control a los 0, 3, 6 y 12 meses, siendo en total 9 meses la ingesta del probiótico, con las siguientes determinaciones:

- Visita 0 (Mes 0): sangre y heces + test EQ-5D-5L.
- Visita 1 (Mes 3): sangre y heces.
- Visita 2 (Mes 6): sangre.
- Visita 3 (Mes 12): sangre y heces + test EQ-5D-5L.

### 2.3. Parámetros bioquímicos

En todos los pacientes se determinaron los siguientes parámetros bioquímicos en los laboratorios de análisis clínicos de cada hospital: urea (mg/dl), creatinina (mg/dl), FG por CKD-Epi (ml/min), cociente albúmina/creatinina (mg/gr), cociente proteína/creatinina (mgr/gr), colesterol LDL (mg/dl), colesterol HDL (mg/dl), albúmina (gr/dl), Hemoglobina (Hb) (gr/dl), ferritina (ng/ml), Saturación transferrina (%), glucemia (mg/dl), Ca (mg/dl), P (mg/dl), Na (mEq/l), K (mEq/l), PTH (pg/ml), Vit.25OHD (ng/ml), proteína C reactiva (PCR, mg/l), Velocidad de sedimentación globular (VSG, mm/h).

### 2.4. Obtención y preparación de muestras biológicas

Todas las muestras de sangre de los pacientes fueron extraídas por el personal de enfermería en las sesiones de control del estudio en cada hospital. Las muestras del hemograma y bioquímica fueron las habituales de los controles rutinarios de los pacientes con ERC y se analizaron en cada hospital. Las muestras de sangre para las toxinas urémicas se recogieron en tubos EDTA estériles de 7 ml para la obtención del plasma (Venoject). Una vez recogidos, se mantuvieron a 4°C hasta proceder a la separación del plasma dentro de las 2 horas siguientes a la extracción. Posteriormente, se centrifugaron entre 1.200-1.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, se recogió la parte superior, correspondiente al plasma, se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su utilización. Las heces fueron recogidas mediante el método utilizado para screening de neoplasia de colon.

Las muestras de sangre para toxinas urémicas y heces para microbiota fueron debidamente etiquetadas para su procesado, enviadas y almacenadas en la HU-FJD para su posterior análisis.

Todos los estudios están regidos bajo la normativa de la Declaración de Helsinki y fueron aprobados por los comités éticos correspondientes.

### 2.5. Extracción de toxinas urémicas del plasma y determinación mediante espectrometría de masas

Las toxinas urémicas utilizadas para este estudio fueron la sal de amonio p-cresol sulfato (pCS) (Alsachim), sal de potasio indoxil sulfato (IS) (Sigma Chemical), ácido fenilacético (Sigma-Aldrich), ácido indolacético (IAA) (Sigma-Aldrich), TMAO (Sigma Chemica) y ácido hipúrico (Sigma-Aldrich).

Para la extracción de las toxinas urémicas del plasma, se cogieron 100 µL de plasma de cada paciente y de cada visita de control (0, 3, y 12) y se mezclaron con 500 µL de metanol. A continuación, se vortearon las muestras durante 1 minuto y se centrifugaron a 6.000 rpm durante

5 minutos. Después, se cogieron 470 µl del sobrenadante y se dejó evaporar hasta sequedad en una centrifuga de concentrador modular (Thermo Scientific Sistemas SpeedVac digitales). Una vez evaporado todo el disolvente, se reconstituyó en 100 µL de acetato amónico 1M pH 7 con 20% de metanol, y se filtró con membranas de PTFE.

Una vez finalizada la extracción se evaluaron las concentraciones plasmáticas de las toxinas urémicas siguientes: TMAO, ácido fenilacético, IS, pCS, ácido hipúrico y IAA mediante HPLC-MS/MS en un sistema Shimadzu de triple cuadrupolo LC-MS/MS (LCMS-8060). Las condiciones para la evaluación combinada se optimizaron en las instalaciones de espectrometría de masas de la Universidad Complutense de Madrid, inyectando 10 µL de muestra en una columna de fase inversa (Phenomenex Gemini 5u C18 110A 150x2 mm) utilizando un gradiente de agua/metanol a 0,3 ml/min para la separación de los analitos. Las transiciones observadas para TMAO fueron 76,10 > 58,10 CE = -23V y 76,10 > 41,95 CE = -40V; para ácido fenilacético 135,00 > 91,10 CE = +10V y 135,00 > 35,30 CE = +35V; para IS 212,1 > 80,00 CE = +21V y 212,1 > 132,00 CE = +20V; para pCS 187,1 > 107,10 CE = +20V y 187,1 > 79,95 CE = +21V; para ácido hipúrico 178,0 > 134,10 CE = +15 V y 178,0 > 77,15 CE = +17 V; y para IAA 174,00 > 130,15 CE = +14V y 174,00 > 42,20 CE = +34V.

## 2.6. Extracción de ADN de heces para determinación de microbiota

Las muestras de heces fueron recolectadas por el HU-FJDen los meses 0, 3, y 12 almacenándose a -80 ° C hasta el procesamiento de las muestras. El ADN microbiano de las muestras se extrajo utilizando el kit QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo del fabricante. La pureza del ADN se evaluó midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm en nanodrop (Implen Nanophotometer) y la concentración del ADN se determinó con un fluorómetro PicoGreen utilizando el kit Invitrogen™ Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España).

## 2.7 Procedimiento metagenómica ARN ribosómico 16S

La secuenciación del gen bacteriano de ARN ribosómico (ARNr) 16S se externalizó en el Parque Científico de Madrid (Campus de Cantoblanco, Madrid), se realizó de las muestras a 3 meses y 12 meses de los 25 pacientes, en total 50 muestras. En primer lugar, se amplificó específicamente el ARNr 16 S de cada muestra mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers específicos marcados con colas CS1/CS2, y después una amplificación secundaria específica de la región 16S V3-V4 con cebadores recomendados por Illumina en dos pasos de PCR. Una vez asegurada la presencia de producto amplificado de PCR, se llevaron a cabo métodos de purificación de los amplicones en caso necesario y titulación por qPCR. El siguiente paso consistió en la secuenciación en Miseq formato 600 ciclos (carrera de 2x300) de

los amplicones previamente amplificados y purificados, estimando la obtención de 100.000 lecturas por muestra. Finalmente se realizó un filtrado de calidad y generación de las lecturas fastq para su análisis bioinformático.

## 2.8 Análisis bioinformático

Una vez obtenidos los archivos en formato fastq, se eliminaron secuencias con calidad inferior a Q20. También se eliminaron las secuencias cortas (inferiores a 100 pb), los primers y las secuencias inferiores a 130 pb. A continuación, se convirtió el formato fastq a fasta y se eliminaron las secuencias contaminantes que pueden ser secuencias eucariontes. Por último, se renombró cada una de las lecturas con el código de la muestra.

Para la comparación de comunidades microbianas se utilizó el programa QIIME 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology), que es capaz de operar con bases de datos de secuenciación de alto rendimiento generado por distintas plataformas. Con este programa se obtuvo las OTUs (unidad taxonómica operativa), la asignación taxonómica correspondiente y los índices de diversidad (alpha y beta), a través de comandos ya preestablecidos en la terminal.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS DE ESTUDIOS *IN VITRO*

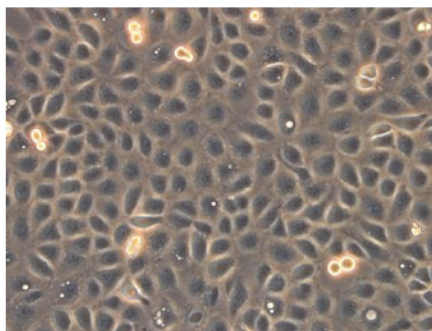
### 3.1. Mantenimiento de las células en cultivo

Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en un incubador bajo una atmósfera constante de 95% de aire, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad al 90%. En cuanto a los procedimientos celulares, pases de mantenimiento, experimentos, etc, se realizaron en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

### 3.2. Cultivos celulares

Las células HK2 son una línea celular de células epitelio-tubulares proximales (CETP) derivadas de riñón normal que fueron obtenidas a través de immortalización mediante transducción de genes del virus del papiloma humano 16 (HPV-16) E6 / E7. En cuanto a sus características, cabe destacar que retienen un fenotipo indicativo de CETP bien diferenciado y conservan características funcionales del epitelio tubular proximal, como por ejemplo el transporte de azúcares dependiente de Na<sup>+</sup> sensible a la florizina, y son capaces de producir y almacenar glucógeno. Por lo tanto, esta línea celular es ampliamente utilizada para realizar experimentos *in vitro* que requieran de células de tipo renal, ya que son capaces de reproducir resultados experimentales obtenidos de CETP recién obtenidos.





**Figura 12. Células tubulares proximales humanas HK2.**

Esta línea celular (HK2) se obtuvo de la compañía ATCC CRL-2190 y se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), enriquecido con suero fetal bovino decoplementado al 10% (FBS, Sigma-Aldrich), y suplementado con penicilina/estreptomicina (100 U/ml y 100 mg/ml, respectivamente, Sigma-Aldrich), 2 mM de L-Glutamina y 36 ng/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich).

Para los ensayos de toxicidad, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos con una densidad de 30.000 células/pocillo. Para las determinaciones proteicas se utilizaron placas p60 (60mm, Sigma-Aldrich), con una densidad de 120.000 células/p60. Las células utilizadas en estos experimentos no presentaban un elevado número de pases (7 a 21).

### **3.3. Tratamiento de los cultivos celulares con bisfenoles (BPA y BPS)**

Para los ensayos *in vitro*, el BPA y el BPS, se disolvieron en DMSO (ThermoFisher Scientific) en una concentración madre de 20 mM, y se utilizó una concentración de 200 y 500 nM, y 1, 10, 25, 50, 100 y 200  $\mu$ M. Tanto para los controles como para los pocillos con presencia de bisfenoles, no se superó el 1% de DMSO/pocillo. Todos los estudios *in vitro* fueron realizados en línea celular HK2.

Para los estudios de toxicidad *per se* y posteriores determinaciones proteicas, los cultivos se mantuvieron en medio libre de suero durante 24 horas antes de los experimentos.

### **3.4. Tratamiento de los cultivos celulares con inhibidores/activadores de la autofagia**

En cuanto a los experimentos con inhibidores y activadores de autofagia, 3 metiladenedina (3MA, Sigma-Aldrich) y rapamicina (Sigma-Aldrich), se hicieron evaluaciones de toxicidad *per se* para cada compuesto a concentraciones entre 2,5-5 mM y 1, 7 y 18  $\mu$ M respectivamente. Una vez determinadas las concentraciones, se realizaron los ensayos de autofagia.



En este caso, los cultivos se mantuvieron en medio con 1% de FBS durante 24 horas antes de los experimentos.

### 3.5. Evaluación de la toxicidad *per se*

Para la evaluación de la toxicidad *per se* de los compuestos analizados a lo largo de esta tesis, se eligió el ensayo colorimétrico de reducción del MTT o bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio, de color amarillo y soluble en medio acuoso. Este compuesto es metabolizado por la acción de las enzimas mitocondriales deshidrogenasas de las células aún viables, formándose así cristales de formazán y dando lugar a una coloración morada e insoluble. Por lo tanto, la cantidad de cristales de formazán producido es proporcional al número de células viables.

Para realizar el ensayo, tras la siembra de las células y su incubación con los estímulos correspondientes durante los tiempos deseados (entre 6-48 horas), se retiró el medio y se lavaron las células con PBS. A continuación, se añadió el MTT junto con PBS a cada pocillo para obtener una concentración final de 0,5 mg/ml. Después, se dejó reaccionar durante 1 hora en el incubador, hasta que se formaron los cristales de formazán. Posteriormente, se retiró el medio y se añadió DMSO para solubilizar los cristales de formazán. Finalmente, se midió la absorbancia de la solución colorimétrica a 540 nm en el lector de placas Tecan. Los datos obtenidos de la señal colorimétrica son proporcionales a la viabilidad celular de cada pocillo.

### 3.6. Estudios de expresión proteica

Las muestras de proteínas totales de los experimentos *in vitro* de células tratadas o de los tejidos renales se extrajeron mediante un tampón de lisis (150 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, 2 mM de EDTA, 2 mM de EGTA, 0,3% IGEPAL, 0,2% de Tritón X-100, 10 µl/ml de cóctel inhibidor de proteínas, 0,2 mM de ortovanadato y 0,2 mM de PMSF). Posteriormente, se cuantificó el contenido proteico mediante el método bicinoninico (BCA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las cantidades de proteína cargada en cada carril oscilaron entre 30 y 60 mg, dependiendo de las proteínas a estudiar. Una vez cuantificados, los extractos proteicos fueron conservados a -80°C hasta su uso. Las proteínas fueron cargadas en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE, 6-15%) en condiciones reductoras y separadas mediante electroforesis. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, BioRad). A continuación, las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo de TBS-T conteniendo un 5% de leche desnatada en polvo o 4% de BSA, dependiendo del anticuerpo empleado, y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 5), durante toda la noche a 4 °C en rotación constante.

**Tabla 5. Relación de los anticuerpos usados en la técnica de detección de proteínas western blot.**

Antígeno	Dilución	Referencia	C. Comercial	Antígeno	Dilución	Referencia	C. Comercial
N-Gal	1/250	Sc-50350	Santa Cruz	LC3I/II	1/1000	NB100-2220	Novus Biologicals
Nrf2	1/500	Sc-365949	Santa Cruz	p.62/SQSTM1	1/1000	5114S	C. Signaling
HO-1	1/500	Sc-136960	Santa Cruz	$\alpha$ -tubulina	1/5000	T5168	S. Aldrich
NQO1	1/500	Sc-32793	Santa Cruz	GAPDH	1/5000	CB1001	Millipore
Fibronectina	1/5000	A2033	Millipore				

Al día siguiente, las membranas se lavaron tres veces en TBS-T en ciclos de 10 minutos y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (Amersham, Tabla 6). Una vez finalizada la segunda incubación, se volvieron a lavar 3 veces con TBS-T en ciclos de 10 minutos. Finalmente, las bandas de proteínas se detectaron por quimioluminiscencia usando el kit ECL (GE Healthcare) en el equipo ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). El análisis de la densidad de las bandas obtenidas se realizó con el programa Quantity One (Bio-Rad).

**Tabla 6. Relación de los anticuerpos secundarios empleados para la detección de proteínas por western blot.**

Secundario	Dilución	Referencia	C. Comercial
Anti-mouse HRP	1/5000	NA931V	Amersham
Anti-rabbit HRP	1/5000	NA934V	Amersham
Anti-goat HRP	1/5000	Ab97110	Abcam

### 3.7. Estudios de expresión génica

La obtención del ARN mensajero (ARNm) del tejido renal congelado se llevó a cabo a través de su pulverización mecánica y resuspensión en tiocianato de guanidinio (Trizol, Invitrogen), reactivo líquido específico para la extracción de ARNm. Por otro lado, para la obtención del ARNm de los cultivos celulares, se raspó cada pocillo o placa p60 con dicho reactivo y se recogió en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml. En ambos casos, se siguieron las recomendaciones de la casa comercial para llevar a cabo la extracción del ARNm de forma correcta. Una vez finalizado el proceso de extracción, se cuantificó la cantidad y pureza del mensajero midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un nanodrop

(Implen Nanophotometer). Solo se utilizaron muestras con una relación de absorbancia A260/280 superior a 1,8 para la transcripción.

A continuación, se obtuvo el ADN complementario (ADNc) de las muestras mediante un kit de alta capacidad de síntesis de ADNc (Applied Biosystems) siguiendo las indicaciones del fabricante. La expresión génica de los diferentes genes estudiados fue analizada empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real mediante el sistema de detección de secuencias Real-Time FAST PCR 7500 (Life Technologies). Para la realización de dicha técnica, se utilizó un estudio multiplex empleando sondas de hibridación para cada gen a estudiar, usando como control una sonda para el gen de la *GAPDH*. Todas las sondas y oligonucleótidos específicos fueron adquiridos de Applied Biosystems (Tabla 7). El número de ciclos y las temperaturas utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante. En todos los experimentos se realizaron medidas por duplicado, utilizando agua ultrapura de tipo I (milliQ o H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) como control negativo. Mediante el programa incluido en el aparato se calculó el número de copias de ARNm a partir del valor Ct. Todos los resultados se normalizaron con sus correspondientes valores de *GAPDH*.

**Tabla 7. Relación de las sondas empleadas en los experimentos de qPCR.**

Gen	Sonda	Gen	Sonda
<i>CCL2/Mcp1</i>	Mm00441242_m1	<i>ATG7</i>	Mm00512209_m1
<i>CCL5/Rantes</i>	Mm01302428_m1	<i>ATG5</i>	Mm01187303_m1
<i>IL-6</i>	Mm00446190_m1	<i>GAPDH</i>	Mm99999915_g1
<i>Havcr1/kim1</i>	Mm00506686_m1	<i>Nrf2</i>	Hs00975960_m1
<i>Lcn2/N-Gal</i>	Mm01324470_m1	<i>NQO1</i>	Hs00168547_m1
<i>Nrf2</i>	Mm00477784_m1	<i>HO-1</i>	Hs01110250_m1
<i>NQO1</i>	Mm00500821_m1	<i>TNF</i>	Hs00174128_m1
<i>HO-1</i>	Mm00516005_m1	<i>IL-6</i>	Hs00174131_m1
<i>Beclin</i>	Mm01265461_m1	<i>GAPDH</i>	Hs02786624_g1
<i>LC3</i>	Mm00458724_m1		

## 4. ESTUDIOS *IN VIVO*

En todos los procedimientos con animales se actuó de acuerdo a las directrices que regulan la investigación animal de experimentación de la UE y con aprobación previa del Comité de Ética de Investigación en Salud del IIS-Fundación Jiménez Díaz. Los ratones utilizados en los estudios tenían un peso aproximado de 25 gr y entre 12 y 14 semanas de edad, procedentes de la cepa C57BL/6 (Charles River, Barcelona, España).

Los días de sacrificio, los animales fueron anestesiados con 5 mg/kg de xilazina (Rompun, Bayer AG) y 35 mg/kg de ketamina (Ketolar, Pfizer). Una vez anestesiados, los ratones se perfundieron con suero salino por vía cardiaca y se extrajeron los riñones, que se dividieron en diferentes secciones dependiendo de las técnicas analíticas que se realizaran posteriormente. Una parte del riñón se fijó en una solución de formaldehído al 4%, que posteriormente se incluyó en parafina para los análisis histoquímicos de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y estudios histológicos de las muestras. El resto de la muestra se congeló en nitrógeno líquido para los estudios de extracción proteica y expresión génica. Adicionalmente, se recogieron muestras de sangre para analizar los niveles plasmáticos de urea y creatinina, así como la orina para evaluar la proteinuria. Para los estudios *in vivo*, el BPA fue resuspendido en aceite de maíz (Sigma-Aldrich) y se administró la dosis de 120 mg/kg/día mediante una inyección intraperitoneal diaria de lunes a viernes y se sacrificaron 2 o 5 semanas después de las administraciones.

### 4.1. Modelo de nefrectomía subtotal (5/6 Nx)

Para los estudios *in vivo* en esta tesis se realizó un modelo de daño renal crónico, la nefrectomía subtotal también denominada nefrectomía de 5/6 (5/6 Nx), al ser aproximadamente la cantidad de masa renal que se elimina. Una vez realizada se administraron dosis de BPA de 120 mg/kg/día a dos tiempos diferentes (2 y 5 semanas). El proceso quirúrgico se realizó en dos fases diferentes, ambos procesos bajo anestesia inhalatoria (isoflurano, utilizando un equipo vaporizador a dosis óptimas 4,5% para inducción, 1-2% para mantenimiento).

En primer lugar, se realizó una incisión abdominal en el lado derecho del animal para tener acceso al espacio peritoneal y localizar el riñón derecho. Tras situarlo, se sujetó la arteria renal con una pinza microvascular (1-2,25 mm) para bloquear el flujo sanguíneo antes de la escisión de los dos polos de este riñón. Dicha escisión se realizó con tijeras quirúrgicas y posteriormente se colocó un trozo de esponja hemostática de gelatina absorbible (gelita medical, DeltaSurgical) para evitar la pérdida de sangre después del restablecimiento del flujo sanguíneo. A continuación, se suturó la incisión abdominal y se



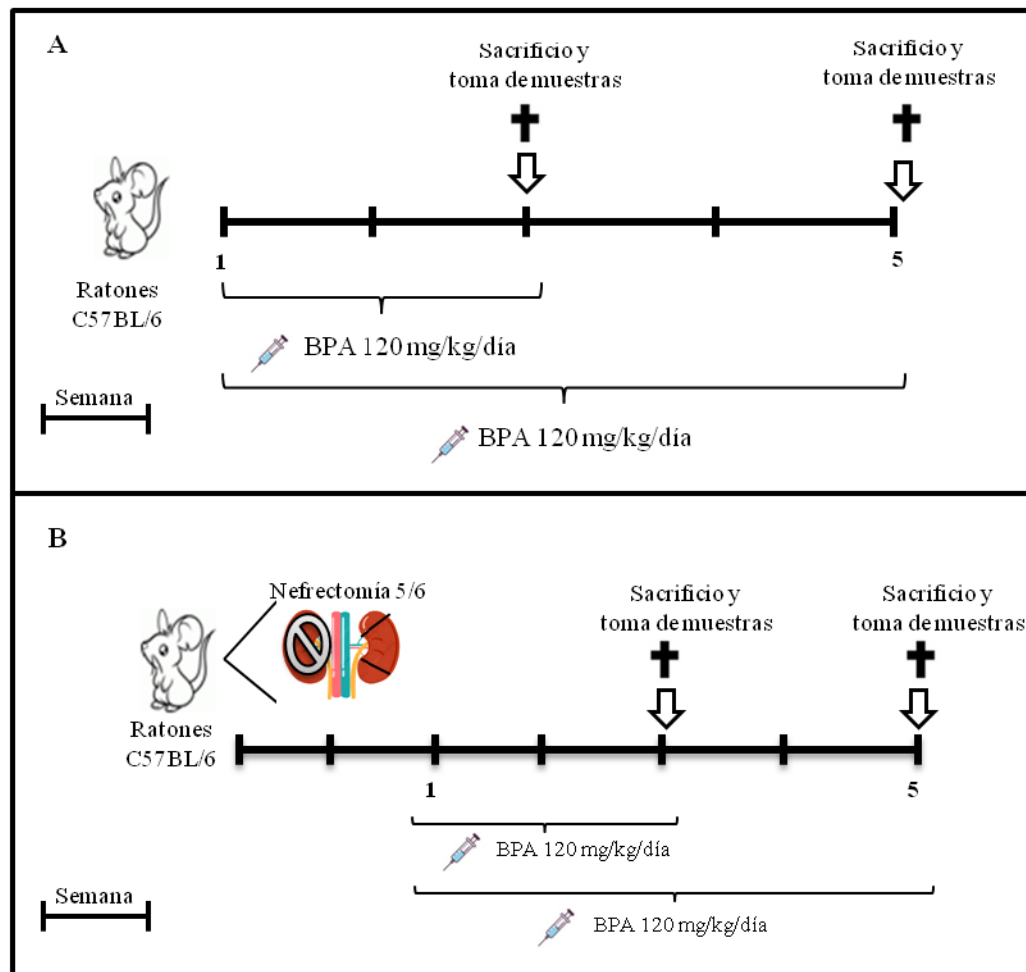
dejó que el animal se recuperase de ella durante una semana.

Transcurrido este periodo, se realizó la segunda cirugía, caracterizada por la nefrectomía izquierda a través de una incisión en este lado del animal. Al localizar el riñón izquierdo, se pasó una sutura quirúrgica alrededor de la arteria renal haciendo un doble nudo, impidiendo así el flujo de sangre. A continuación, se extrajo el riñón mediante un corte con tijeras quirúrgicas. Finalmente, se suturó la herida abdominal y se dejó una semana de recuperación. Para los ratones del grupo control, se les simuló ambas operaciones, para la primera se realizó una incisión en el lado derecho y se identificaron los dos polos del riñón, y luego se cerró la incisión. De manera similar, se esperó una semana, y se realizó una incisión en el lado izquierdo, identificando la arteria renal izquierda y riñón, para posteriormente cerrar la incisión en este lado.

Una vez realizadas las operaciones y tras el tiempo de recuperación, los ratones fueron expuestos al BPA disuelto en aceite de maíz como se ha mencionado anteriormente. A los grupos control se les administró como vehículo aceite de maíz. También se administró BPA a los ratones control a dosis y tiempos iguales que a los ratones nefrectomizados. Así pues, se estudiaron seis grupos: (i) vehículo; (ii) BPA administrado 2 semanas; (iii) BPA administrado 5 semanas; (iv) 5/6 Nx vehículo; (v) 5/6 Nx administrado 2 semanas con BPA; (vi) 5/6 Nx administrado 5 semanas con BPA.

Todos los ratones fueron sacrificados 2 y 5 semanas después de iniciar la administración de BPA (n= 4-7 por grupo). En los estudios realizados se compararon los riñones de los ratones sanos, los riñones de los ratones nefrectomizados sin administración de BPA, los riñones de ratones sanos con administración de BPA y los riñones de los ratones nefrectomizados con administración de BPA (Figura 13).





**Figura 13. Representación esquemática de la línea temporal en el modelo de administración de BPA.** Administración de BPA a ratones con función renal normal (A) y ratones con disfunción renal, nefrectomía 5/6 (B).

## 5. ESTUDIOS DE HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

Las muestras obtenidas del tejido renal de los modelos animales fueron incluidas en parafina y cortadas en el micrótopo en secciones de 3  $\mu\text{m}$  y montadas en portaobjetos tratados con polilisina. Para realizar las diferentes determinaciones histológicas o inmunohistoquímicas, las muestras se desparafinaron e hidrataron, y finalmente se incluyeron en xilol y en un gradiente decreciente de etanol (100°, 96° y 70°).

### 5.1. Morfología renal

Con el fin de evaluar la morfología del tejido renal, se llevaron a cabo diversas tinciones histológicas. En primer lugar, se realizó la tinción hematoxilina-eosina, la cual se

basa en la tinción de diferente color de las estructuras celulares ácidas y básicas mediante un colorante básico (hematoxilina) y otro ácido (eosina). Una vez hidratados los cortes, se añadió la hematoxilina (Richard-Allan Scientific) durante 10 minutos. A continuación, los cortes fueron lavados con agua corriente durante 10 minutos aproximadamente. Posteriormente, se añadió la eosina (ThermoFisher Scientific) durante unos segundos. Finalmente se procedió a deshidratar los cortes (etanol 96° dos veces 3 minutos, etanol 100° 3 minutos), se fijaron en xilol y se montaron en DPX (ThermoFisher Scientific).

Otra de las tinciones histológicas realizadas para la evaluación del tejido renal fue la tinción PAS (ácido peryódico de Schiff), utilizada para detectar polisacáridos en los tejidos, tanto glucógeno como mucopolisacáridos. Una vez desparafinadas e hidratadas las muestras, se expusieron los portaobjetos al ácido peryódico al 0,5% durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizan varios lavados con agua durante 10 minutos. A continuación, se añadió el reactivo de Schiff (ThermoFisher Scientific) durante 20 minutos en oscuridad, periodo tras el cual se realizan los lavados con agua durante 10 minutos, y se contrastó con hematoxilina. Después, se vuelven a lavar las muestras con agua corriente durante 15 minutos. Por último, se deshidrataron las muestras (etanol 96° dos veces 3 minutos, etanol 100° 3 minutos), se fijaron en xilol y se montaron en DPX.

Otra de las tinciones utilizadas para la evaluación morfológica renal, es la técnica de rojo sirio para fibras de colágeno, mediante la cual se puede cuantificar el grado de fibrosis mediante análisis de imagen. Previamente a realizar la tinción, se preparó la solución en la cual se mezcla 10 ml de rojo sirio (Sigma-Aldrich) al 1% con 90 ml de la solución acuosa de ácido pícrico saturada, dejándolo reposar durante 48 horas antes de usar. Las muestras antes de ser tratadas con dicha solución se dejaron durante 5 días en etanol, puesto que está descrito que la reacción se intensifica. Transcurridos los días, se expusieron los portaobjetos a la solución de rojo sirio durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se deshidrataron y se montaron las muestras.

## **5.2. Inmunohistoquímica**

Las secciones de riñón en parafina (3  $\mu$ m) se desparafinaron durante 24 horas a 60°C para realizar los estudios de inmunohistoquímica. El protocolo de recuperación antigénica se realizó mediante el sistema PTlink (Dako Diagnostic) con tampón de citrato sódico a 10 mmol/L ajustado a pH 6 o 9, dependiendo de las condiciones del anticuerpo primario proporcionadas por la casa comercial. En primer lugar, se bloqueó la peroxidasa endógena incubando las muestras durante 15 minutos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. Asimismo, para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo primario, las muestras se bloquearon con

una solución TBS/BSA 4%-8% de suero perteneciente a la misma especie del anticuerpo secundario durante 1 hora. Por último, se incubaron las muestras con el anticuerpo específico durante toda la noche a 4 °C (Tabla 8).

**Tabla 8. Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en técnicas de inmunohistoquímica.**

Antígeno	Dilución	Referencia	C. comercial
CD3 <sup>+</sup>	Preparada comercialmente	A0452	Dako
Ab Secundario	Dilución	Referencia	C. comercial
Anti-rabbit biotina	1/5000	AP-132B	Millipore

Se realizaron controles negativos para verificar la especificidad de los anticuerpos, omitiendo el anticuerpo primario en algunas muestras. La intensidad de las áreas teñidas se obtuvo utilizando el software Image-Pro Plus, utilizando 10 campos al azar de cada corte (20X). Los datos obtenidos se expresaron como área positiva teñida con respecto al área total.

### 5.3. Inmunofluorescencia

Al igual que las anteriores muestras antes de iniciar la tinción, se desparafinaron y fueron sometidas a un protocolo de recuperación antigénica usando el sistema PTlink, con tampón citrato sódico 10 mmol/L con pH 6, dependiendo de las especificaciones del anticuerpo, en este caso las de LC3I/II. Después, las muestras fueron bloqueadas con 10% de BSA (albúmina sérica bovina) y 10% de FBS durante 1 hora. Posteriormente, se incubó el tejido con el anticuerpo primario LC3I/II (1/200) durante toda la noche a 4 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron las muestras con la solución PBS-T 1X durante 30 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente AlexaFluor 488 de conejo (1/200, Invitrogen) a temperatura ambiente durante 1 hora y oscuridad. Finalmente, después de los lavados, se marcaron las muestras con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich) para teñir los núcleos, y montarlos en ProLong Gold (Thermo Fisher Scientific). Las muestras fueron examinadas mediante microscopia confocal (Confocal System TCS SP5, Leica).

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados presentados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM), los datos de los pacientes se expresan en rango intercuartil o como frecuencias absolutas y relativas, según corresponda. El valor máximo de probabilidad establecido fue de 0,05 para ser estadísticamente significativo, y todas las comparaciones utilizaron la prueba de hipótesis bilateral. Los análisis se realizaron con el software estadístico R 3.6.3.

Los datos obtenidos de los pacientes se analizaron de diferentes formas. En un primer análisis se agruparon los datos de los pacientes del estudio agudo, independientemente del dializador y se compararon con el grupo control. Otro de los análisis realizados, consistió en comparar los diferentes analitos en función del dializador en ambos estudios. Las comparaciones entre los valores se realizaron mediante prueba de los rangos con signo de Wilcoxon o la prueba de Kruskal-Wallis. En cuanto al siguiente análisis, se realizó ANOVA de una vía para comparar los valores pre y post-diálisis al inicio del estudio y después de 3 meses. Finalmente, los análisis en las muestras de probióticos, tanto para la comparación de especies bacterianas en las heces como para la comparación de las toxinas urémicas en plasma, se utilizó la prueba de Mann-Whitney/Kruskal-Wallis o la t de student según se trataran de variables normales o no normales.

En el modelo animal se compararon los ratones control con los ratones nefrectomizados y no nefrectomizados expuestos a BPA. También se compararon los ratones control nefrectomizados con el resto de los ratones. Para realizar el estudio estadístico entre los diferentes grupos se utilizó la prueba de Mann-Whitney/Kruskal-Wallis o la t de student según se trataran de variables normales o no normales.

En cuanto a los experimentos *in vitro*, los resultados expuestos son de al menos cuatro experimentos independientes. Las diferencias estadísticas se realizaron comparando los grupos control con grupos experimentales mediante un análisis de Mann-Whitney o t de student de forma idéntica al apartado anterior.

# RESULTADOS

---

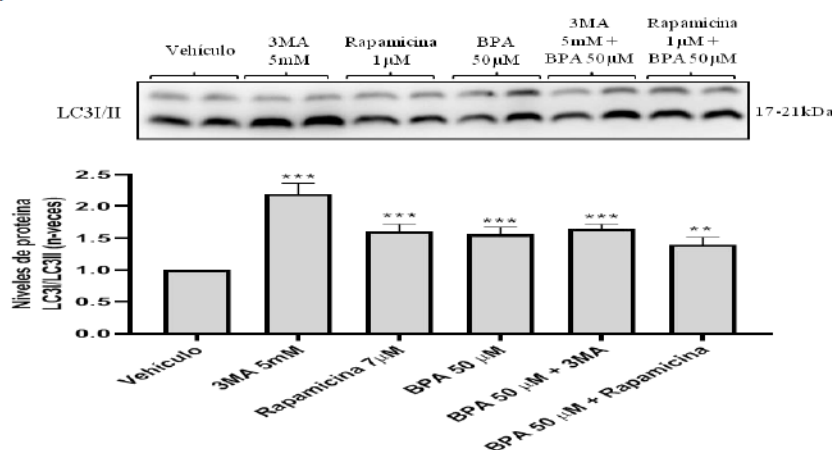


## 1. Efecto del BPA en células epiteliales del túbulo proximal renal humano (HK2)

### 1.1. La presencia de BPA induce el bloqueo de la maduración del autofagosoma en células epiteliales del túbulo proximal renal humano en cultivo

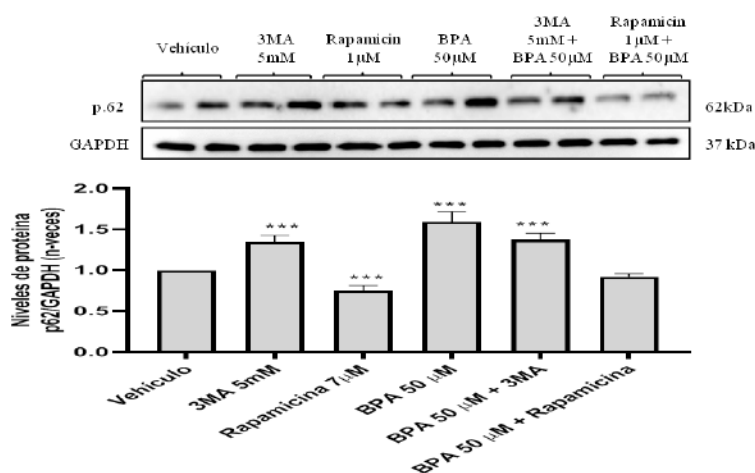
En primer lugar, nos propusimos evaluar la acción del BPA en cultivo celular en la vía de señalización autofágica, ya que es un proceso que participa en la homeostasis celular y está altamente relacionado con las principales vías de señalización implicadas en la progresión de la ERC, como son el estrés oxidativo, inflamación y fibrosis. Con el fin de observar el efecto del BPA sobre la autofagia, realizamos los experimentos *in vitro* en células tubuloepteliales humanas (línea celular HK2). Las células fueron tratadas con BPA (50  $\mu$ M), con el inhibidor de autofagia 3MA (5 mM) o con el inductor de autofagia rapamicina (1  $\mu$ M) para comparar el efecto de estos con el BPA. Por último, también se preincubaron las células con el inhibidor o el inductor de autofagia una hora antes de la estimulación con BPA para estudiar si eran capaces de revertir el efecto de este o de potenciar su acción.

Para ello, se determinaron los niveles proteicos de uno de los principales marcadores del flujo autofágico, LC3II. Estos resultados indicaron que el tratamiento con BPA produce un incremento significativo de los niveles proteicos de LC3II en comparación con las células sin tratar. También podemos observar como tanto el inhibidor 3MA como el inductor rapamicina incrementan dichos niveles de forma significativa. La preincubación de ambos compuestos con el BPA no produjo ningún cambio en comparación con los resultados obtenidos con el BPA solo (Figura 14).



**Figura 14. La estimulación con BPA produce un incremento en la expresión proteica de LC3II en las células renales en cultivo.** Las células tubuloepteliales renales (línea celular HK2) fueron tratadas con BPA a 50  $\mu$ M, y los estímulos 3MA a 5 mM y rapamicina a 1  $\mu$ M, durante 24 horas. Los niveles proteicos de LC3 fueron detectados mediante western blot. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM de 5 experimentos independientes. \*\* p < 0,01 vs Vehículo; \*\*\* p < 0,001 vs Vehículo.

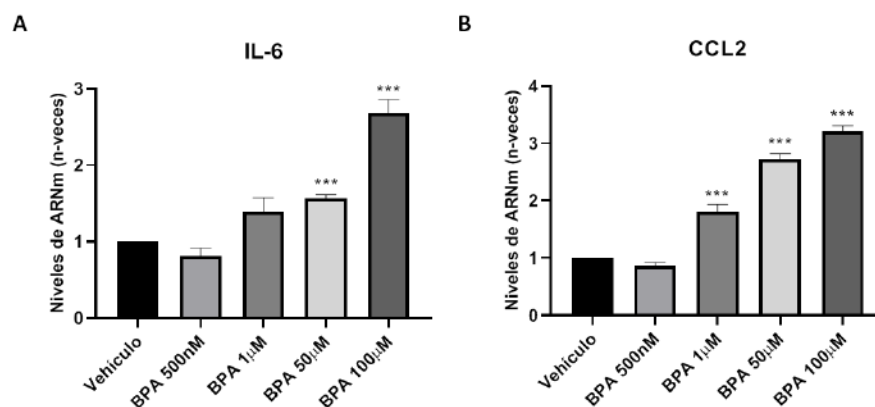
Tras estudiar la expresión proteica de LC3II, procedimos a evaluar el efecto del BPA en otro de los marcadores clave en el flujo autofágico, la proteína p62/SQSTM1, cuya expresión se disminuye como consecuencia de su degradación al fusionarse con el lisosoma. La estimulación con BPA produjo un incremento significativo de los niveles proteicos de p62/SQSTM1 en comparación con el grupo control, obteniendo el mismo resultado que el inhibidor de autofagia 3MA. Sin embargo, la estimulación de las células con rapamicina produjo una disminución significativa de dichos niveles (Figura 15). Por lo tanto, la estimulación de las células con BPA produce un incremento de ambas proteínas (LC3II y p62/SQSTM1), hecho que hace indicar que el flujo autofágico está bloqueado, al igual que sucede con la administración del inhibidor 3MA.



**Figura 15.** La estimulación con BPA indujo el incremento de la expresión proteica de p62/SQSTM1 en las células renales en cultivo, produciendo el bloqueo en la maduración del autofagosoma en las células renales en cultivo. Las células tubuloepteliales renales (línea celular HK2) fueron tratadas con BPA a 50 µM, y los estímulos 3MA a 5 mM y rapamicina a 1 µM, durante 24 horas. Los niveles proteicos de p62/SQSTM1 fueron detectados mediante western blot. Los datos se expresan como media ± EEM de 5 experimentos independientes. \*\*\*  $p < 0,001$  vs Vehículo.

### 1.2. La estimulación con BPA induce la expresión de genes proinflamatorios en células epiteliales del túbulo proximal renal humano en cultivo

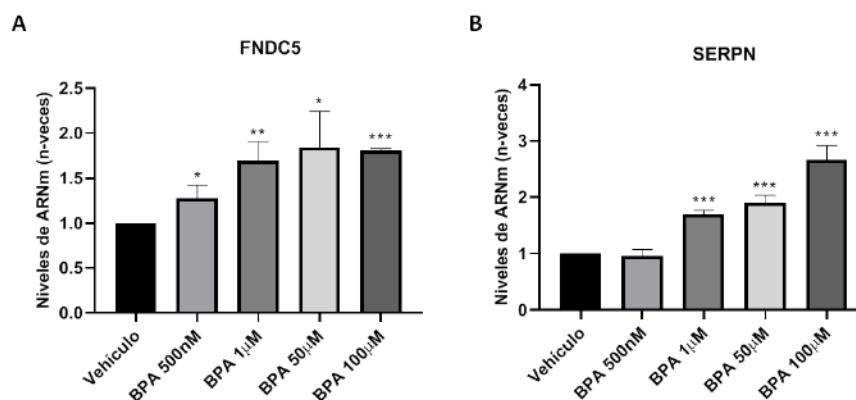
A continuación, con el fin de conocer si el BPA era capaz de inducir una respuesta inflamatoria en células renales, se realizaron estudios *in vitro* en células tubuloepteliales humanas en cultivo, línea celular HK2. Para ello, las células fueron estimuladas con BPA a las concentraciones de 500 nM, 1 µM, 50 µM y 100 µM, a tiempos cortos (6 horas). En células HK2, la estimulación con BPA incrementó de forma significativa la expresión génica de citoquinas proinflamatorias, como *IL-6* y *CCL2* de manera concentración dependiente (Figura 16). Así pues, la estimulación con BPA en células renales produjo la inducción de genes proinflamatorios suponiendo el inicio de la respuesta inflamatoria.



**Figura 16. La estimulación con BPA produce un aumento en la expresión de genes proinflamatorios en células renales en cultivo.** El cultivo se realizó con células tubuloepiteliales renales (línea HK2) que se incubaron con BPA a diferentes concentraciones (500 nM, 1 μM, 50 μM, 100 μM) durante 6 horas. Se determinó la expresión de (A) IL-6 y (B) CCL2 por qPCR en tiempo real. Los datos se expresan como media ± EEM de 4 experimentos independientes. \*\*\* p < 0,001 vs Vehículo.

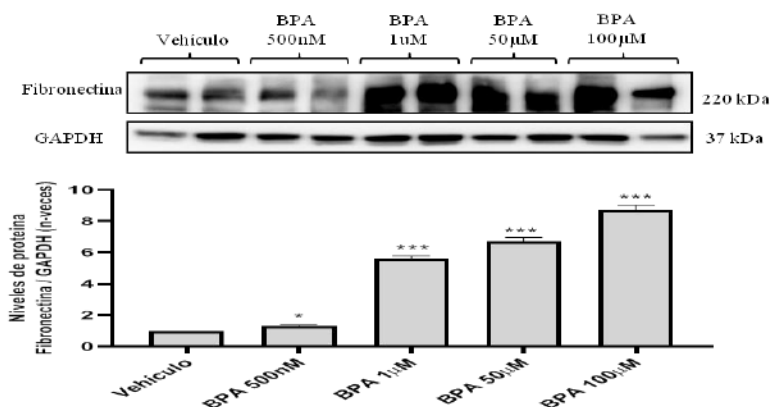
### *1.3. La estimulación con BPA promueve el incremento de marcadores profibróticos en células epiteliales del túbulo proximal renal humano en cultivo*

El proceso fibrótico es consecuencia de un daño producido que se cronifica en el tiempo. Este daño puede ser causado por diferentes agentes, como el BPA que, como hemos demostrado anteriormente, produce un incremento en la respuesta inflamatoria en células tubuloepiteliales humanas. Como hemos comentado previamente, el proceso fibrótico es clave en la progresión de la ERC, por lo que nos propusimos evaluar el efecto del BPA sobre la fibrosis en células renales (línea celular HK2). Para dicho estudio, se trataron las células con diferentes concentraciones de BPA (500 nM, 1 μM, 50 μM y 100 μM) durante 12 horas y se realizaron estudios de expresión génica. La estimulación con BPA produjo un incremento significativo concentración dependiente de la expresión génica de marcadores fibróticos como *FND5* y *SERP* (Figura 17).



**Figura 17. La estimulación con BPA produce un aumento en la expresión de genes profibróticos en células renales en cultivo.** El cultivo se realizó con células tubuloepteliales renales (línea HK2) y se incubaron con BPA a diferentes concentraciones (500 nM, 1 µM, 50 µM, 100 µM) durante 12 horas. Se determinó la expresión de (A) *FNDC5* y (B) *SERPN* por qPCR en tiempo real. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM de 4 experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  vs Vehículo; \*\*  $p < 0,01$  vs Vehículo; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Vehículo.

A continuación, se estudió si el tratamiento de las células con BPA producía la liberación al medio extracelular de fibronectina, un marcador clave para esta vía. Para ello, se trataron las células con BPA (500 nM, 1 µM, 50 µM y 100 µM) durante 48 horas y posteriormente se realizaron los estudios de expresión de dicha proteína. En la figura 18 se puede observar cómo la presencia de BPA durante 48 horas aumentó significativamente los niveles proteicos de fibronectina, incluso con las concentraciones menores.



**Figura 18. La estimulación con BPA produce un incremento en la expresión proteica de fibronectina en las células renales en cultivo.** Las células tubuloepteliales renales (línea celular HK2), se incubaron con BPA a diferentes concentraciones (500 nM, 1 µM, 50 µM, 100 µM) durante 48 horas. La expresión proteica de fibronectina se determinó mediante western blot. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM de 4 experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  vs Vehículo; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Vehículo.

Por lo tanto, la estimulación del cultivo celular con BPA produjo un incremento en la expresión génica y proteica de componentes clave para la formación de la matriz extracelular, como la fibronectina o el colágeno tipo I, III o IV.



## 2. Evaluación del efecto del BPA en un modelo animal de nefrectomía 5/6

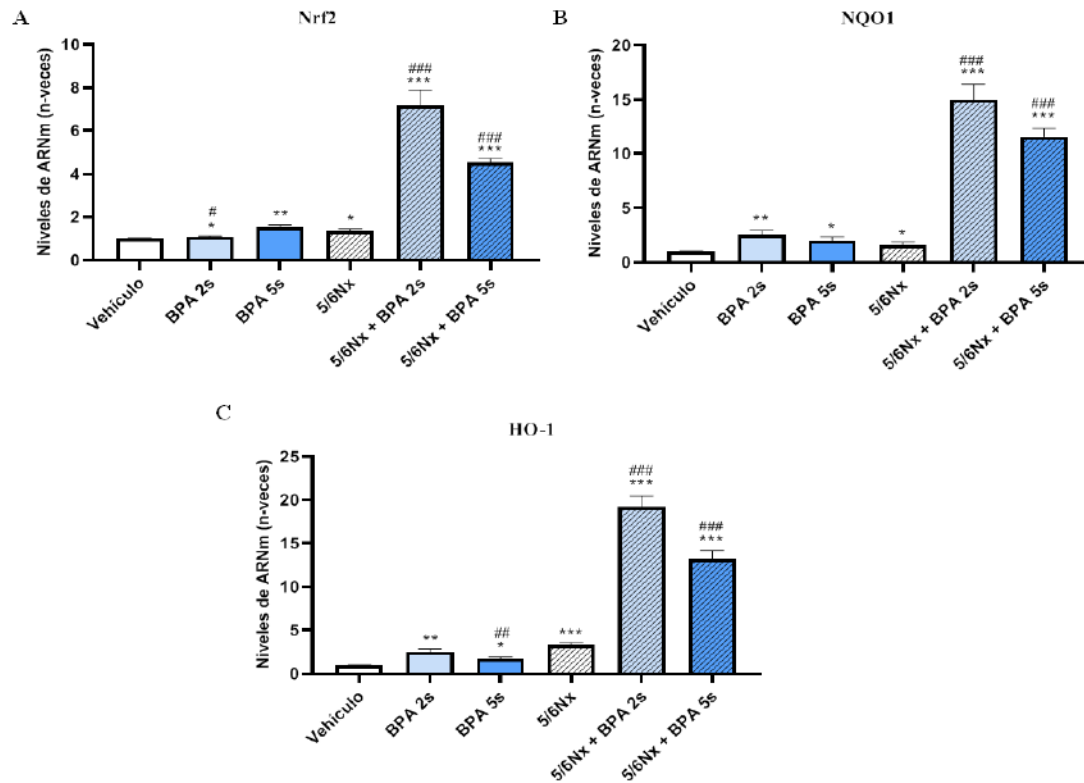
El siguiente paso fue estudiar *in vivo* si la presencia de BPA en el organismo podría inducir un incremento en la respuesta inflamatoria, estrés oxidativo y fibrosis, todos ellos procesos clave para la progresión de la ERC. Para ello, se seleccionó un modelo de daño renal experimental que simulase un estadio avanzado de la enfermedad renal, como es el modelo de nefrectomía subtotal o 5/6. También se estudió la presencia de BPA en animales sin patologías renales previas para observar el efecto producido por esta molécula BPA y si este era capaz de inducir daño renal. En ambos grupos de animales se administraron dosis de BPA 120 mg/kg/día durante 4 días a la semana, a lo largo de 2 y 5 semanas.

### *2.1. La administración sistemática de BPA promueve la activación de la vía Nrf2 en el riñón en el modelo experimental nefrectomía 5/6 y en ratones con función renal normal*

En antecedentes previos de nuestro grupo, se demostró que el BPA es capaz de generar un incremento de ROS intracelular en cultivo celular, favoreciendo así la activación de diversas rutas como inflamación y fibrosis claves para la progresión de la ERC.<sup>155</sup> Así pues, quisimos evaluar la capacidad del BPA en la producción de dicho daño, pero ante la limitación de las muestras de riñón encontradas (nefrectomía subtotal), se optó por cuantificar el estrés oxidativo generado por el BPA observando la respuesta antioxidante desencadenada tras su exposición.

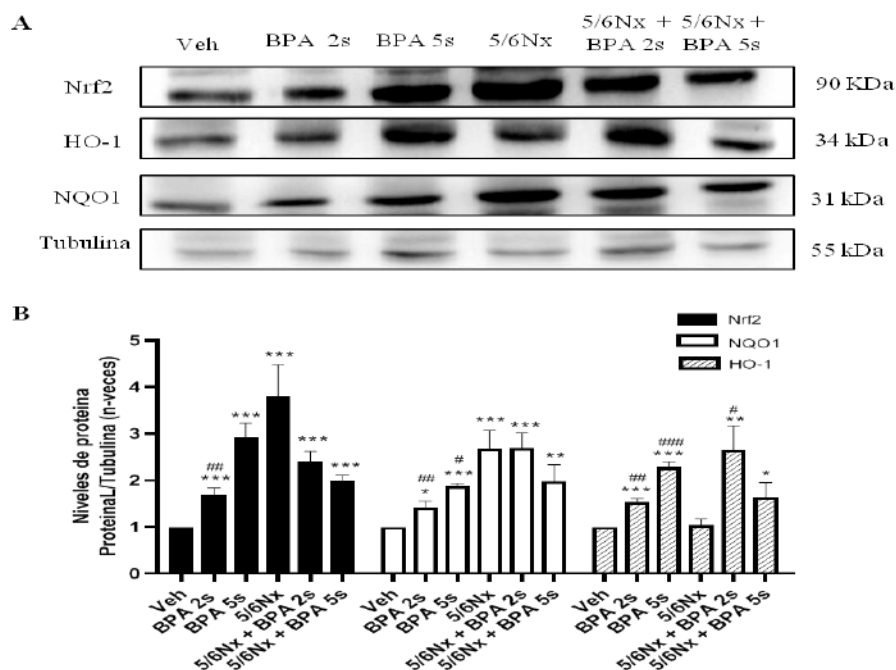
En primer lugar, se estudió la vía de señalización Nrf2, puesto que es la principal ruta reguladora de la expresión de genes antiinflamatorios, lo cual es capaz de proteger las células del daño generado por el estrés oxidativo.<sup>202</sup> Para determinar si el BPA era capaz de modular la vía de señalización Nrf2 en los riñones, se estudió su expresión génica y la de sus genes diana como NQO1 y HO-1 por qPCR en tiempo real. La administración de BPA incrementó los niveles de Nrf2, NQO1 y HO-1 en todos los ratones expuestos en comparación con el grupo control. Además, los ratones con nefrectomía subtotal y expuestos a BPA mostraron una sobreexpresión exacerbada en la expresión génica de Nrf2 y de sus genes diana en comparación con los ratones nefrectomizados sin BPA (Figura 19).





**Figura 19. La administración de BPA incrementa la expresión génica del sensor de estrés oxidativo Nrf2 y de sus genes diana NQO1 y HO-1 en el modelo experimental.** La expresión de (A) *Nrf2*, (B) *NQO1* y (C) *HO-1* se determinó por qPCR en tiempo real, en tejido renal lisado en el modelo experimental de nefrectomía 5/6 y ratones salvajes de la cepa C57BL/6 expuestos a BPA (120 mg/kg/día) durante 2 y 5 semanas. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 4-7 animales por grupo. \*  $p < 0,05$  vs Control; \*\*  $p < 0,01$  vs Control; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control; #  $p < 0,05$  vs 5/6 Nx; ###  $p < 0,001$  vs 5/6 Nx.

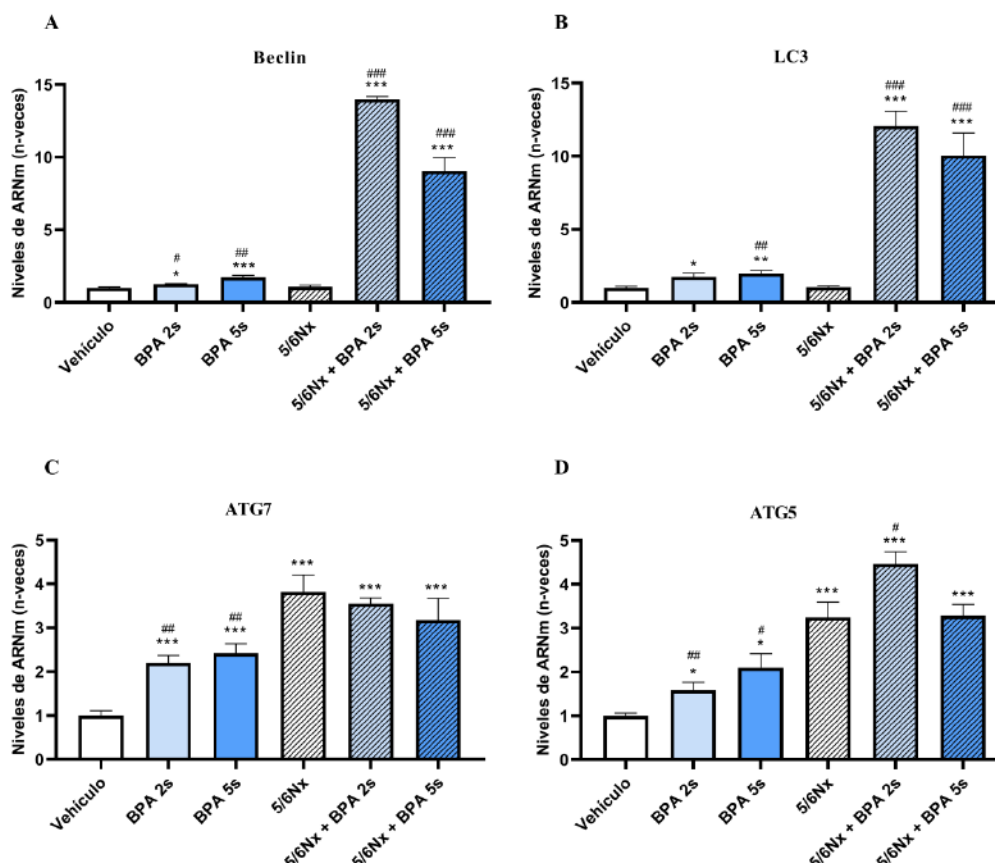
A continuación, para explorar en profundidad si la administración de BPA es capaz de inducir la activación de esta vía, analizamos los niveles proteicos de Nrf2 y de sus dianas por western blot. En la figura 20 se puede observar cómo los grupos expuestos a BPA tanto a 2 semanas como a 5 semanas presentan un incremento significativo en los niveles proteicos de Nrf2, así como en los de NQO1 y HO-1. Estos datos, junto con los obtenidos en la expresión génica, sugieren que la exposición a BPA en todos los grupos estudiados promueve la activación de la vía antioxidante Nrf2, para reequilibrar así el balance oxidativo celular generado por el incremento de ROS causado por el BPA.



**Figura 20. La administración de BPA produce un aumento en los niveles proteicos tanto de Nrf2 como de sus genes dianas en el modelo experimental.** Los niveles de Nrf2, NQO1 y HO-1 fueron analizados por western blot en un modelo de nefrectomía 5/6 y ratones salvajes de la cepa C57BL/6 expuestos durante 2 y 5 semanas a BPA (120 mg/kg/día). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 4-7 animales por grupo. \*  $p < 0,05$  vs Control; \*\*  $p < 0,01$  vs Control; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control; #  $p < 0,05$  vs 5/6 Nx; ##  $p < 0,01$  vs 5/6 Nx; ###  $p < 0,001$  vs 5/6 Nx.

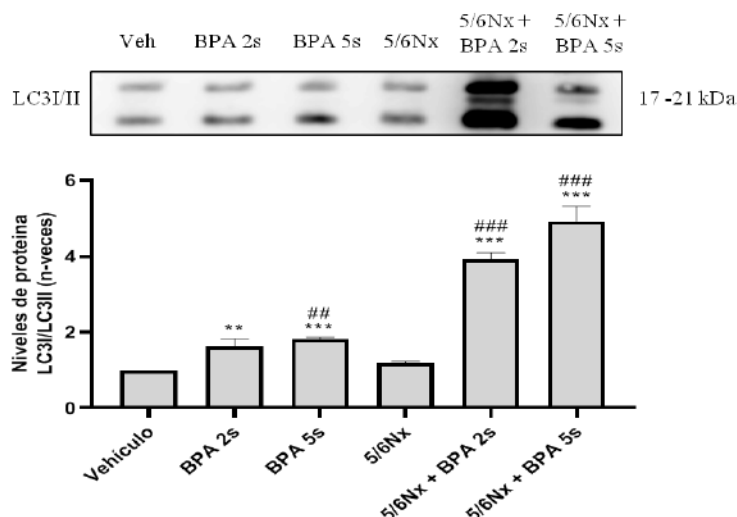
## 2.2. La administración crónica de BPA en el modelo experimental induce el bloqueo en la maduración del autofagosoma en el riñón

Las evidencias actuales sugieren que la autofagia desarrolla un papel clave en el daño crónico renal.<sup>203-205</sup> En el orden de seguir investigando el efecto de la administración de BPA sobre su posible implicación en la progresión de la ERC, decidimos estudiar cómo actúa el BPA en esta patología. En primer lugar, analizamos la expresión génica de reguladores claves en dicha ruta como *Beclin*, *ATG5*, *ATG7* y *LC3*, observándose un incremento significativo en todos los marcadores autofágicos estudiados después de la exposición de BPA a 2 y 5 semanas en todos los ratones, siendo este aumento especialmente superior en los grupos nefrectomizados comparados con el control. Además, los grupos nefrectomizados expuestos a BPA, independientemente del tiempo de administración, presentaron una remarcada sobreexpresión génica de *LC3* y *Beclin* comparados con los dos grupos control (Vehículo y 5/6 Nx) (Figura 21).

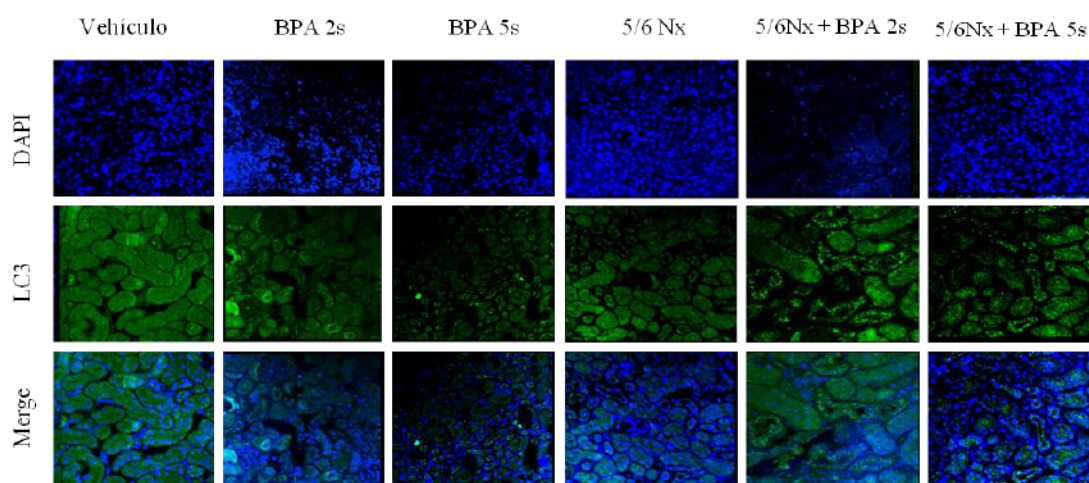


**Figura 22. Incremento en los niveles de expresión de genes implicados en la autofagia después de la exposición de BPA en el modelo experimental renal.** La expresión de (A) *Beclin*, (B) *LC3*, (C) *ATG7* y (D) *ATG5* se determinó por qPCR en tiempo real, en tejido renal lisado en el modelo experimental de nefrectomía 5/6 y ratones salvajes de la cepa C57BL/6 expuestos a BPA (120 mg/kg/día) durante 2 y 5 semanas. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 4-7 animales por grupo. \*  $p < 0,05$  vs Control; \*\*  $p < 0,01$  vs Control; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control; #  $p < 0,05$  vs 5/6 Nx; ##  $p < 0,01$  vs 5/6 Nx; ###  $p < 0,001$  vs 5/6 Nx.

Por otro lado, se estudiaron los niveles de expresión de LC3II, por ser una de las proteínas más importantes en la ruta autofágica, utilizando las técnicas de western blot e inmunofluorescencia. Todos los grupos expuestos a la administración de BPA, tanto a 2 como a 5 semanas, incrementaron significativamente los niveles proteicos de LC3II, en especial los grupos nefrectomizados, que aumentaron sus niveles hasta 4 y 6 veces más que los grupos control (Vehículo y 5/6 Nx) de manera tiempo dependiente (Figura 23). Estos resultados fueron confirmados mediante inmunofluorescencia, observando un incremento de LC3 en los túbulos renales después de la administración de BPA en comparación con el grupo control, especialmente los grupos nefrectomizados, que presentan una mayor agregación de esta proteína (Figura 24).



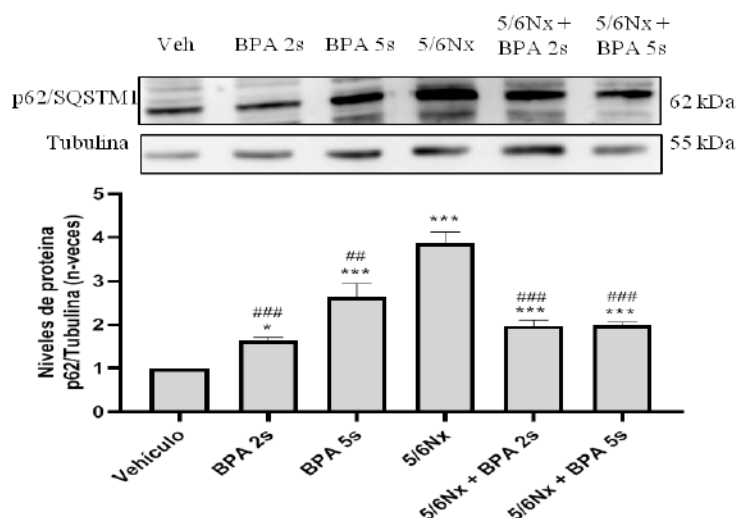
**Figura 23. La administración de BPA, tanto aguda como crónica, produce el incremento de la expresión proteica de LC3.** Se determinó la expresión proteica de LC3 mediante western blot en el modelo animal de nefrectomía 5/6 y ratones salvajes de la cepa C57BL/6 expuestos a 2 y 5 semanas a BPA (120 mg/kg/día). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 4-7 animales por grupo. \*\* p < 0,01 vs Control; \*\*\* p < 0,001 vs Control; ## p < 0,01 vs 5/6 Nx; ### p < 0,001 vs 5/6 Nx.



**Figura 24. La administración de BPA produce el incremento de LC3 en los túbulos renales del modelo experimental.** La localización de LC3 en los túbulos renales fue realizada por técnicas de inmunofluorescencia. La imagen muestra la proteína LC3 (verde) en riñones del modelo experimental. Los núcleos están teñidos con DAPI (azul). La figura muestra una foto representativa de cada grupo por microscopia confocal (10X).

Finalmente, una vez obtenidos los resultados de LC3II, se evaluó el efecto de la administración de BPA sobre otro de los marcadores clave en el flujo autofágico, p62/SQSTM1. Los niveles de esta proteína se incrementaron significativamente en todos los grupos después de la exposición a BPA en comparación con el grupo control (Figura 25).





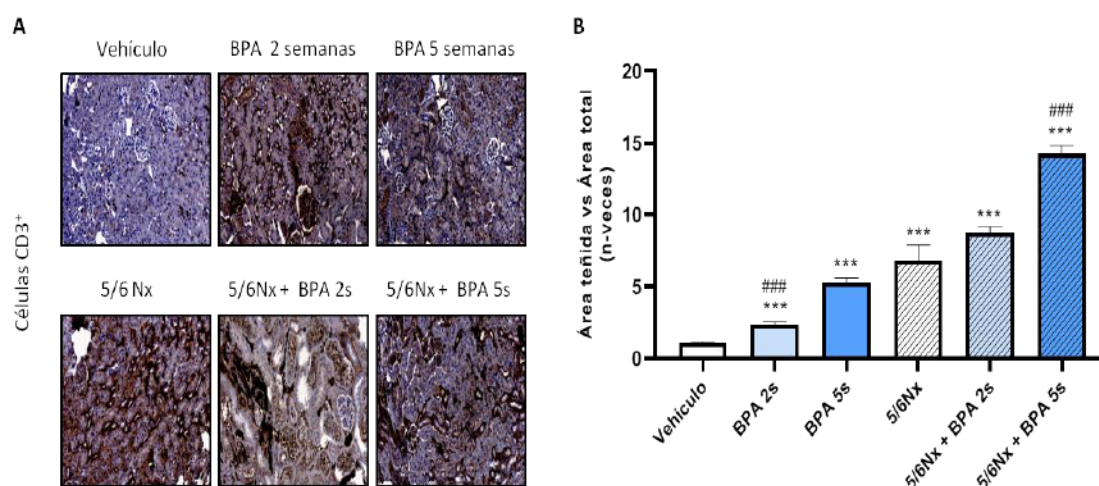
**Figura 25. La exposición a BPA produce la acumulación e incremento de la proteína p62/SQSTM1, produciendo el bloqueo en la maduración del autofagosoma en el modelo experimental.** Se determinó la expresión proteica de p62/SQSTM1 mediante western blot en el modelo animal de nefrectomía 5/6 y ratones salvajes de la cepa C57BL/6 expuestos a 2 y 5 semanas a BPA (120 mg/kg/día). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 4-7 animales por grupo. \*  $p < 0,05$  vs Control; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control; ##  $p < 0,01$  vs 5/6 Nx; ###  $p < 0,001$  vs 5/6 Nx.

Los resultados obtenidos demostraron que la administración de BPA en ambos grupos (grupo sin nefrectomizar y grupo nefrectomizado), incrementó el contenido del autofagosoma. La acumulación de LC3II y p62/SQSTM1 indica la inhibición del flujo autofágico, puesto que se encuentra bloqueada la fusión del autofagosoma con el lisosoma en los riñones de este modelo, al igual que observábamos en los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro*.

### 2.3. La exposición crónica a BPA induce infiltración de células inflamatorias intersticiales e incremento de la expresión de factores proinflamatorios en el modelo experimental

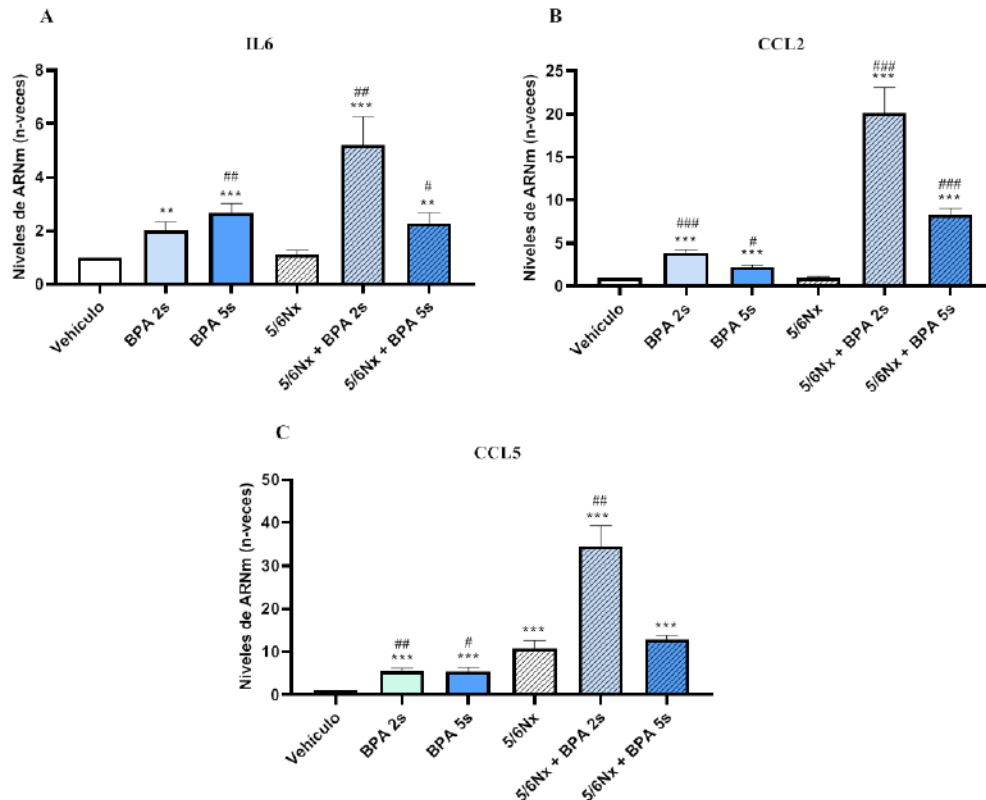
Tras determinar que la exposición al BPA producía el incremento de marcadores de daño renal, a continuación, nos propusimos estudiar si dicha exposición podía incrementar la inflamación renal, proceso clave en la patología renal. En primer lugar, mediante técnicas de inmunohistoquímica se caracterizó el infiltrado inflamatorio, y se observó que en los riñones de los ratones sin operar expuestos a BPA existía una marcada presencia de linfocitos T CD3<sup>+</sup> en el espacio intersticial renal, siendo superior cuanto mayor era el tiempo de exposición. Por otro lado, los ratones con nefrectomía subtotal también presentaron un aumento significativo en la infiltración de células inflamatorias, lo cual se incrementó con la exposición en estos ratones a BPA, tanto a 2 como a 5 semanas (Figura 26).





**Figura 26. La administración de BPA incrementa la infiltración de células inflamatorias intersticiales en tejido renal.** Este modelo se llevó a cabo en ratones de la cepa C7BL/6 y se estudió el efecto del BPA después de 2 y 5 semanas. Algunos ratones fueron o no operados con una nefrectomía 5/6, y se expusieron a BPA (120mg/kg/día, intraperitoneal) o vehículo (aceite de maíz). En las secciones de riñón incluidas en parafina se evaluó la presencia de células inflamatorias usando anticuerpos contra linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) (A), mostrándose también la cuantificación (B). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 4-7 animales por grupo. \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control; ###  $p < 0,001$  vs 5/6 Nx.

El reclutamiento de células inflamatorias en el riñón depende en parte de la síntesis local de citoquinas y quimioquinas que actúan como mediadores proinflamatorios.<sup>206</sup> Por ello, se determinó la expresión génica de diversos marcadores claves en el proceso inflamatorio, como *IL-6*, *CCL2* y *CCL5*, mediante qPCR en tiempo real. Tras esta determinación se observó que todos los grupos de ratones expuestos a BPA (120 mg/kg/día) mostraron un incremento significativo de la expresión de estos mediadores comparados con los riñones de los ratones no tratados ni operados, tanto a las 2 como a las 5 semanas. Además, los ratones con nefrectomía subtotal expuestos a BPA presentaron una sobreexpresión de dichos genes en comparación con los ratones nefrectomizados sin tratar (Figura 27).



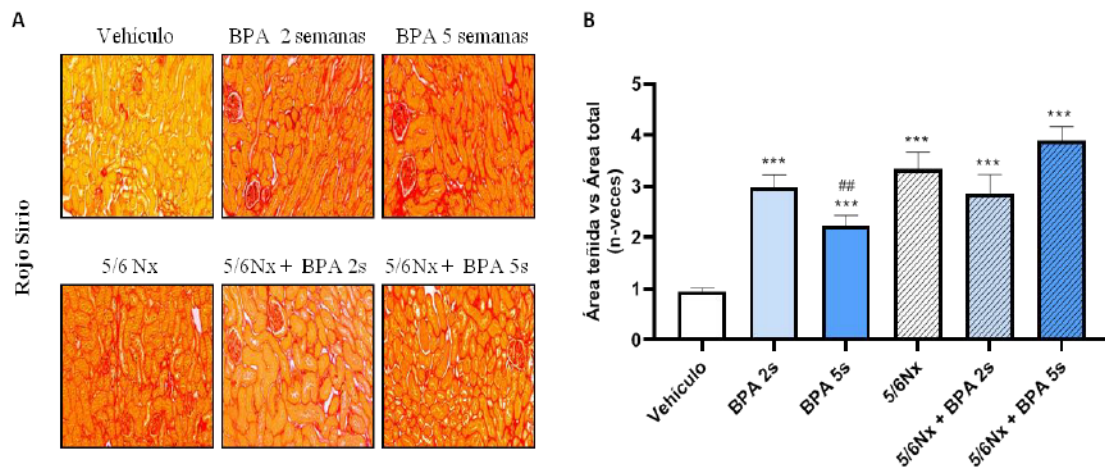
**Figura 27. El BPA incrementa la expresión de genes proinflamatorios en el modelo renal experimental.** Se determinó la expresión de (A) *IL-6*, (B) *CCL2* y (C) *CCL5* por qPCR en tiempo real en tejido renal lisado del modelo experimental nefrectomía 5/6. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 4-7 animales por grupo. \*\*  $p < 0,01$  vs Control; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control; #  $p < 0,05$  vs 5/6 Nx; ##  $p < 0,01$  vs 5/6 Nx; ###  $p < 0,001$  vs 5/6 Nx.

Todos estos resultados muestran que la exposición de los riñones a BPA incrementó la respuesta inflamatoria, caracterizada por la sobreexpresión de mediadores proinflamatorios como *IL-6*, *CCL2* y *CCL5*, y el incremento de la infiltración de células inflamatorias intersticiales. Esta respuesta inflamatoria fue superior en los ratones con nefrectomía subtotal expuestos a BPA.

#### 2.4. La exposición crónica a BPA induce fibrosis renal en el modelo experimental con presencia o no de disfunción renal previa

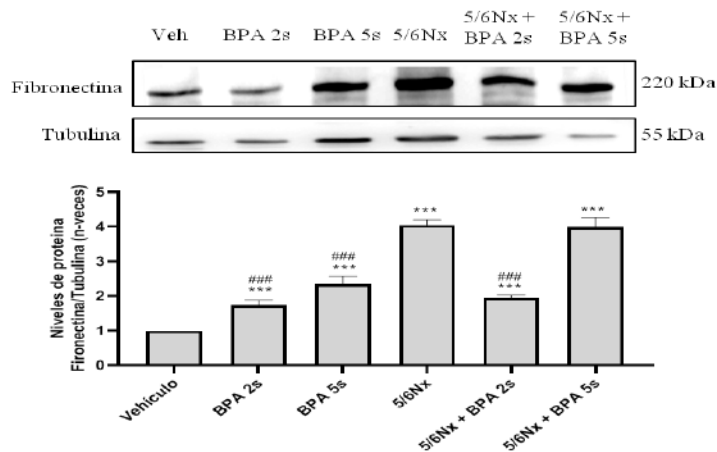
Como se ha comentado en la *Introducción*, el proceso fibrótico es clave en la progresión de la ERC. En este sentido, los ensayos *in vitro* mostraron que la estimulación con BPA produjo un incremento de los principales marcadores fibróticos. Por ello, nos propusimos comprobar si los resultados obtenidos *in vitro* se correlacionaban con los realizados *in vivo* y así confirmar que la estimulación con BPA produce la inducción de la respuesta profibrótica.

En primer lugar, se realizó la cuantificación de los depósitos de colágeno en las muestras de riñón de los ratones mediante la tinción de rojo sirio. Como podemos observar en la figura 28, los ratones expuestos a BPA sufrieron un incremento en los depósitos de colágeno en el tejido renal. La cuantificación de la tinción muestra que los ratones sin nefrectomizar expuestos a BPA incrementaron los depósitos de colágeno en comparación con el grupo control. Sin embargo, los grupos nefrectomizados expuestos a BPA no aumentaron en gran medida sus depósitos de colágeno en comparación con el grupo nefrectomizado sin BPA.



**Figura 28.** La exposición a BPA produce incremento de la expresión de colágeno en el modelo experimental, determinado por tinción con rojo sirio. La imagen muestra una tinción con rojo sirio en riñones del modelo experimental (A), donde el incremento en la expresión de colágeno se observa de color rojo, mostrándose también la cuantificación (B). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 4-7 animales por grupo. \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control; ##  $p < 0,01$  vs 5/6 Nx.

A continuación, se realizaron experimentos de western blot para medir los niveles de fibronectina, uno de los componentes principales de los depósitos de la matriz extracelular formados en el proceso fibrótico. En estos experimentos se pudo observar el incremento significativo en la síntesis de fibronectina en todos los grupos expuestos a BPA en comparación con el grupo control. Por otro lado, la exposición de BPA en los ratones nefrectomizados no incrementó significativamente los niveles de fibronectina en comparación con el grupo nefrectomizado sin BPA (Figura 29).

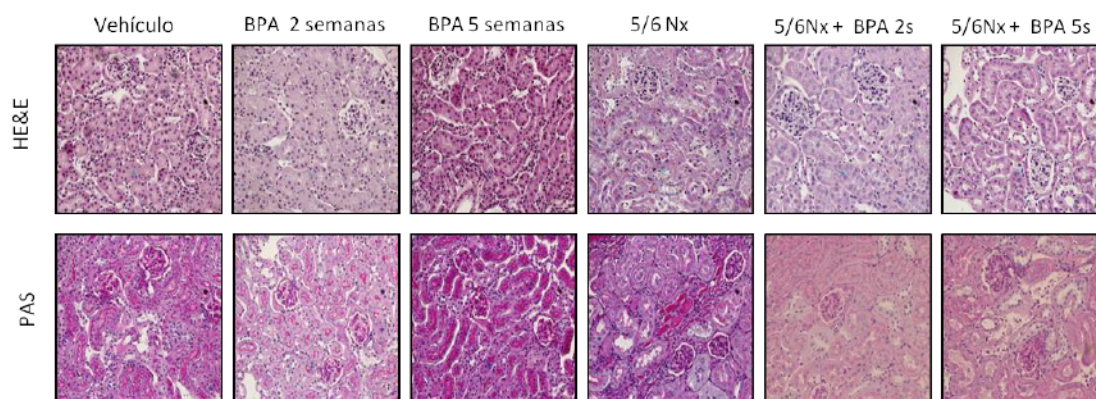


**Figura 29. La exposición a BPA produce un incremento en los niveles de expresión proteica de fibronectina en el modelo experimental.** Se determinó la expresión proteica de fibronectina mediante western blot en el modelo animal de nefrectomía 5/6 y ratones salvajes de la cepa C57BL/6 expuestos a 2 y 5 semanas a BPA (120 mg/kg/día). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 4-7 animales por grupo. \*\*\* p < 0,001 vs Control; ### p < 0,001 vs 5/6 Nx.

## 2.6. La administración crónica de BPA induce daño renal en el modelo experimental nefrectomía 5/6 y en el modelo sin daño renal previo

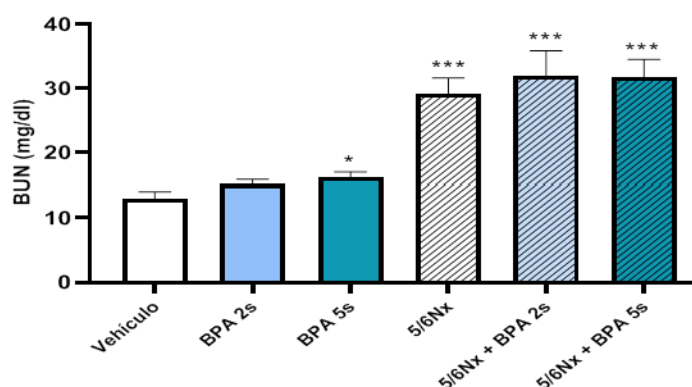
En último lugar, decidimos estudiar el efecto de la exposición de BPA en la lesión renal experimental. Así pues, la progresión del daño renal fue evaluada tras la administración de BPA (120 mg/kg/día) en ratones salvajes sin patologías renales previas y en ratones sometidos a nefrectomía subtotal (5/6 Nx) a diferentes tiempos (2 y 5 semanas) comparados con los grupos control (ratones tipo salvaje inyectados con vehículo). Las lesiones renales histológicas fueron examinadas por las tinciones de hematoxilina y eosina y tinción de PAS, en las cuales se observó que los ratones inyectados con BPA mostraron cambios histológicos renales más graves comparados con el grupo control, caracterizados por dilatación y daño tubular (Figura 30).





**Figura 30.** La administración de BPA induce cambios morfológicos en los riñones, como dilatación tubular en el modelo experimental de nefrectomía 5/6 y sin operar. El modelo fue llevado a cabo en ratones de la cepa C7BL/6 y se estudió el efecto del BPA a 2 y 5 semanas. Algunos ratones fueron operados con una nefrectomía 5/6 y expuestos a BPA (120mg/kg/día, intraperitoneal) o vehículo (aceite de maíz) durante 2 o 5 semanas. En las secciones de riñón incluidas en parafina se evaluó la morfología renal mediante la tinción con hematoxilina-eosina y la histoquímica de PAS.

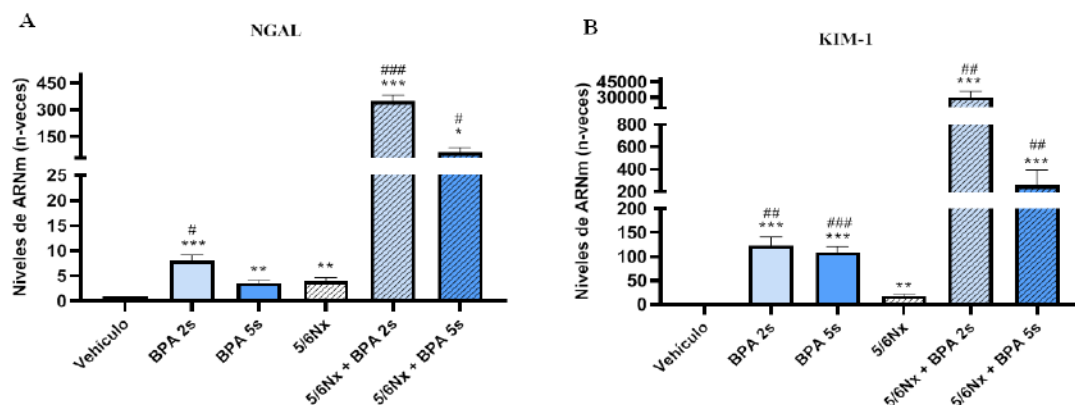
A continuación, quisimos evaluar si la administración de BPA había comprometido el filtrado renal, por lo que evaluamos los niveles plasmáticos de urea (BUN, mg/dl). Se observó cómo la exposición a BPA incrementó significativamente los niveles de BUN en los ratones de tipo salvaje a las 5 semanas. Sin embargo, en los ratones expuestos a BPA durante 2 semanas, pese a que se observó una tendencia al alza, este incremento no fue significativo. Por otro lado, todos los ratones con nefrectomía subtotal sufrieron un aumento significativo en la acumulación de BUN respecto a los ratones control, y aunque los expuestos a BPA no sufrieron incrementos significativos en comparación con los nefrectomizados sin BPA, se observa una tendencia al alza (Figura 31).



**Figura 31.** La exposición a BPA durante 5 semanas produce un incremento en BUN en el modelo experimental sin nefrectomía. Los niveles plasmáticos de BUN se determinaron mediante ELISA en el modelo experimental. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 4-7 animales por grupo. \*  $p < 0,05$  vs Control; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control.

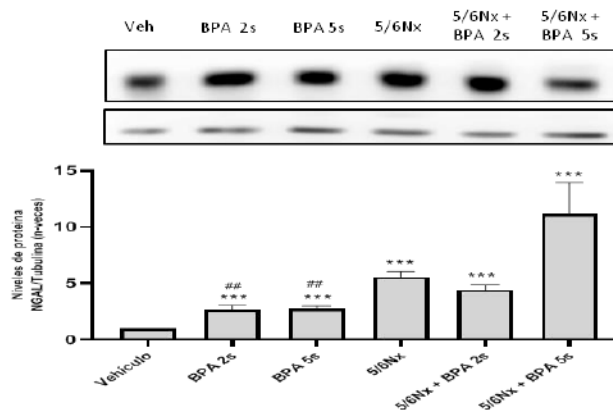


Adicionalmente, evaluamos los niveles de expresión génica renal catalogados como biomarcadores de daño renal, como *NGAL* y *KIM-1*. Así, se observó que la expresión génica de estos biomarcadores renales se incrementó significativamente en todos los grupos expuestos a BPA, en especial en los ratones con nefrectomía subtotal. Cabe destacar que los ratones sin nefrectomía subtotal y expuestos a BPA también incrementaron de forma significativa la expresión de dichos genes en comparación con los ratones con nefrectomía subtotal (Figura 32).



**Figura 32. El BPA incrementa la expresión de los marcadores de daño renal NGAL y KIM-1 en modelo experimental con función renal normal y nefrectomía 5/6.** Se determinó la expresión de *NGAL* (A) y *KIM-1* (B) por qPCR en tiempo real, en tejido renal lisado en un modelo experimental durante 2 y 5 semanas a una dosis de 120 mg/kg/día de BPA. Algunos ratones fueron nefrectomizados previamente a la exposición. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 4-7 animales por grupo. \*  $p < 0,05$  vs Control; \*\*  $p < 0,01$  vs Control; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control; #  $p < 0,05$  vs 5/6 Nx; ##  $p < 0,01$  vs 5/6 Nx; ###  $p < 0,001$  vs 5/6 Nx.

Finalmente, evaluamos los niveles proteicos del biomarcador renal NGAL, observando también como todos los grupos expuestos a BPA incrementaron significativamente los niveles proteicos en comparación con los grupos control. Estos resultados sugieren que la exposición a BPA, a 2 y 5 semanas, produjo la pérdida de función renal tanto en los grupos con y sin nefrectomía subtotal (Figura 33).



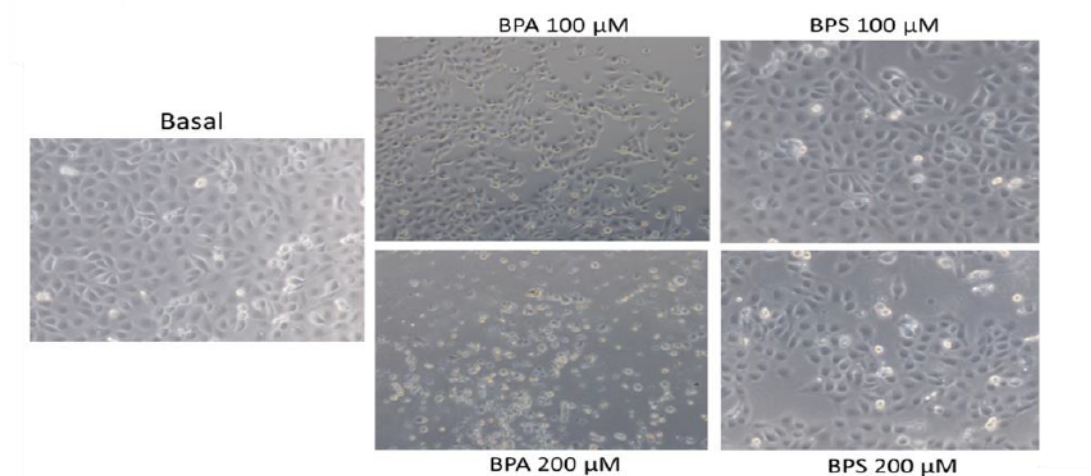
**Figura 33. La administración de BPA produce un incremento en los niveles proteicos de NGAL en el modelo experimental nefrectomía 5/6 y en los animales con función renal normal.** Los niveles proteicos de NGAL fueron analizados mediante western blot en el modelo experimental nefrectomía 5/6. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM de 4-7 animales por grupo. \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control; ##  $p < 0,01$  vs 5/6 Nx.

### 3. Evaluación del efecto del BPS en células epiteliales del túbulo proximal renal humano (HK2) como alternativa al BPA

Una vez obtenidos los resultados sobre la acción del BPA en ensayos *in vitro* e *in vivo*, y tras observar la acción perjudicial del BPA sobre la progresión de la ERC, quisimos evaluar la alternativa propuesta por la industria para la sustitución del BPA, el BPS, estudiando los efectos de este en ensayos *in vitro* en células tubuloepiteliales humanas.

#### 3.1. Estudio de la citotoxicidad *per se* del BPS y BPA en células epiteliales del túbulo proximal renal humano en cultivo

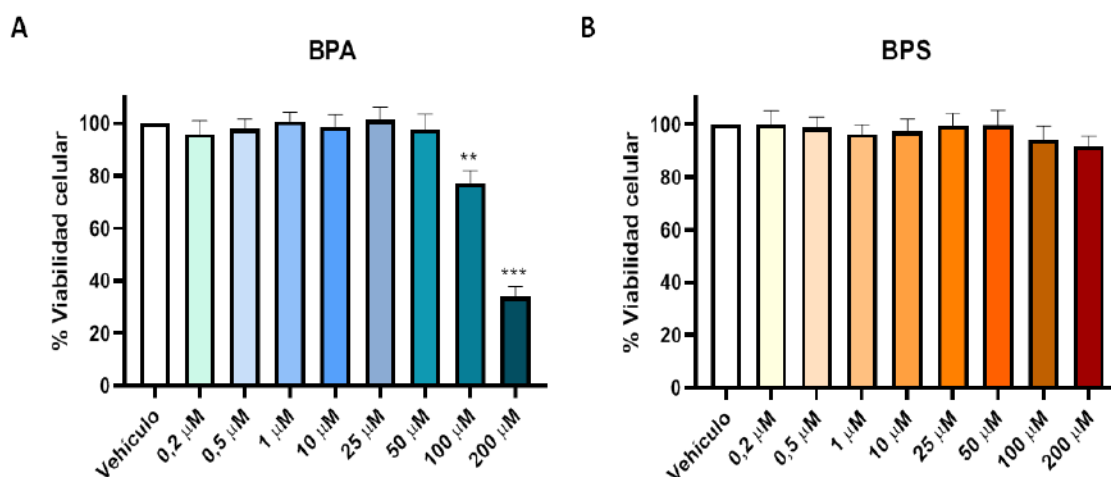
En primer lugar, evaluamos la toxicidad *per se* del BPS en comparación con la del BPA a concentraciones equimolares en células tubuloepiteliales humanas en cultivo. Así estudiamos el impacto de ambas moléculas a diferentes concentraciones entre 200 nM y 200  $\mu$ M, durante 24 horas. Como podemos observar en las imágenes de microscopía de contraste de fases (Figura 34), las concentraciones de BPA a 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M resultaron ser perjudiciales para las células, puesto que estas perdieron su morfología basal, y a 200  $\mu$ M su adhesión a la placa. Sin embargo, la estimulación con BPS a las mismas concentraciones no mostró cambios morfológicos celulares de gran significancia, aunque a 200  $\mu$ M se observa pérdida de confluencia en comparación con el cultivo basal (Figura 34).



**Figura 34. La estimulación con BPS no produjo cambios morfológicos en las células HK2, al contrario que la estimulación con BPA.** Representación gráfica mediante microscopio de contraste de fases. Estimulación con BPA y BPS a 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M durante 24 horas en células tubuloepiteliales renales humanas (20X).

A continuación, indagamos el efecto de dichas moléculas en un ensayo de viabilidad celular medido por el método de reducción MTT. Para ello, estimulamos las células HK2 con concentraciones crecientes de ambas moléculas, desde 200 nM a 200  $\mu$ M durante 24 horas.

Las células estimuladas con BPA presentaron una disminución de la viabilidad celular entorno a un 25% a 100  $\mu$ M, y hasta un 70% a la concentración máxima, considerando estas dos concentraciones citotóxicas para las células. Por otro lado, la estimulación con BPS no produjo una reducción de la viabilidad celular tan drástica en comparación con el BPA, reduciendo un 10% la viabilidad celular a 200  $\mu$ M (Figura 35).



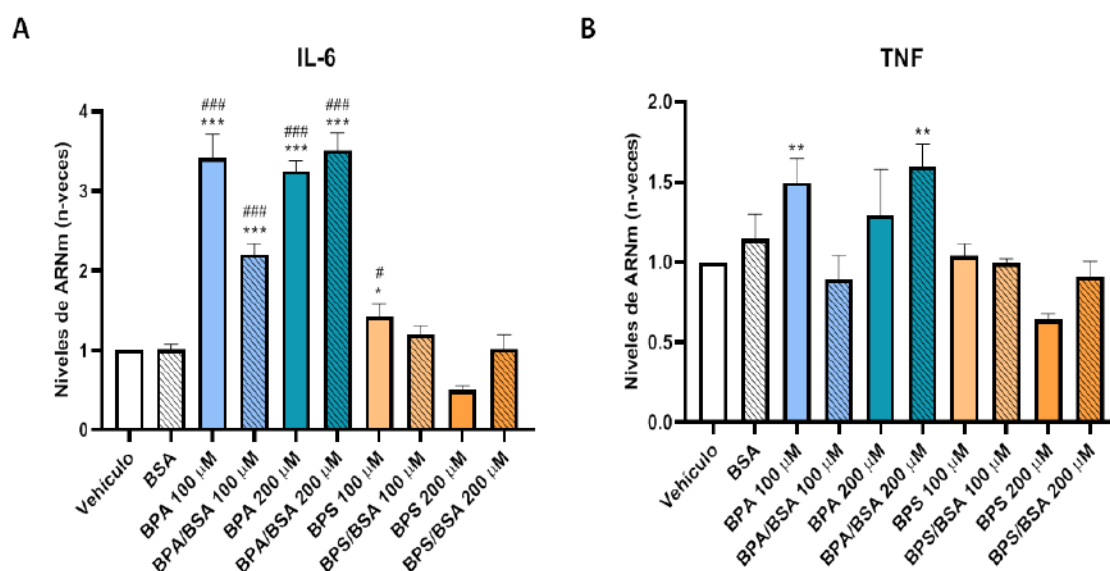
**Figura 35.** La estimulación con BPS no produjo una reducción de la viabilidad celular a diferencia del BPA. El cultivo se realizó con células tubuloepteliales renales humanas (HK2) y se incubaron con BPA o BPS e a diferentes concentraciones (desde 200 nM a 200  $\mu$ M) durante 24 horas. Se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM de 5 experimentos independientes. \*\* p < 0,01 vs Vehículo; \*\*\* p < 0,001 vs Vehículo.

Por lo tanto, la estimulación de las células tubuloepteliales renales humanas con BPS a concentraciones elevadas no produjo una disminución significativa de la viabilidad celular ni produjo cambios en la morfología celular. Sin embargo, la estimulación con BPA a concentraciones iguales o superiores de 100  $\mu$ M sí produjo una disminución significativa de la viabilidad celular y produjo cambios morfológicos en la línea celular HK2.

### 3.2. La estimulación con BPS produce una menor expresión de genes proinflamatorios en comparación con el BPA en células epiteliales del túbulo proximal renal humano en cultivo

Con el fin de evaluar la capacidad del BPS para inducir una respuesta inflamatoria, se realizaron estudios *in vitro* en células tubuloepteliales humanas en cultivo (línea celular HK2), y se comparó su efecto con el producido por el BPA. Para ello, las células fueron estimuladas con BPA o BPS a 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M, en ausencia o presencia de albúmina (BSA), durante 6 horas.

La estimulación con BPA produjo un incremento significativo 4 veces mayor en comparación con los grupos control en la expresión génica de la citoquina proinflamatoria IL-6, en ausencia o presencia de BSA. Por otro lado, la estimulación con BPS en ausencia de BSA ocasionó un incremento significativo en la expresión génica de IL-6 a 100  $\mu$ M, pero no aumentó en presencia de BSA, aunque a concentraciones de 200  $\mu$ M no se incrementó la expresión génica de dicha citoquina. Sin embargo, la estimulación con ambas moléculas, en ausencia o presencia de BSA, no incrementó significativamente la expresión génica de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$ , aunque sí se observa una tendencia creciente con la estimulación de BPA (Figura 36). Por lo tanto, la estimulación con BPS en células renales no produjo la inducción de genes proinflamatorios en comparación con el efecto del BPA.



**Figura 36. La estimulación con BPS no produce un aumento en la expresión génica de genes proinflamatorios en células renales en cultivo, en comparación con el BPA que sí produce un incremento de expresión.** El cultivo se realizó con células tubuloepteliales renales humanas (línea HK2), las cuales se incubaron con BPS o BPA a 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M durante 6 horas, en ausencia o presencia de BSA. Se determinó la expresión de (A) IL-6 y (B) TNF- $\alpha$  por qPCR en tiempo real. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  vs Vehículo; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Vehículo; ###  $p < 0,001$  vs BSA.

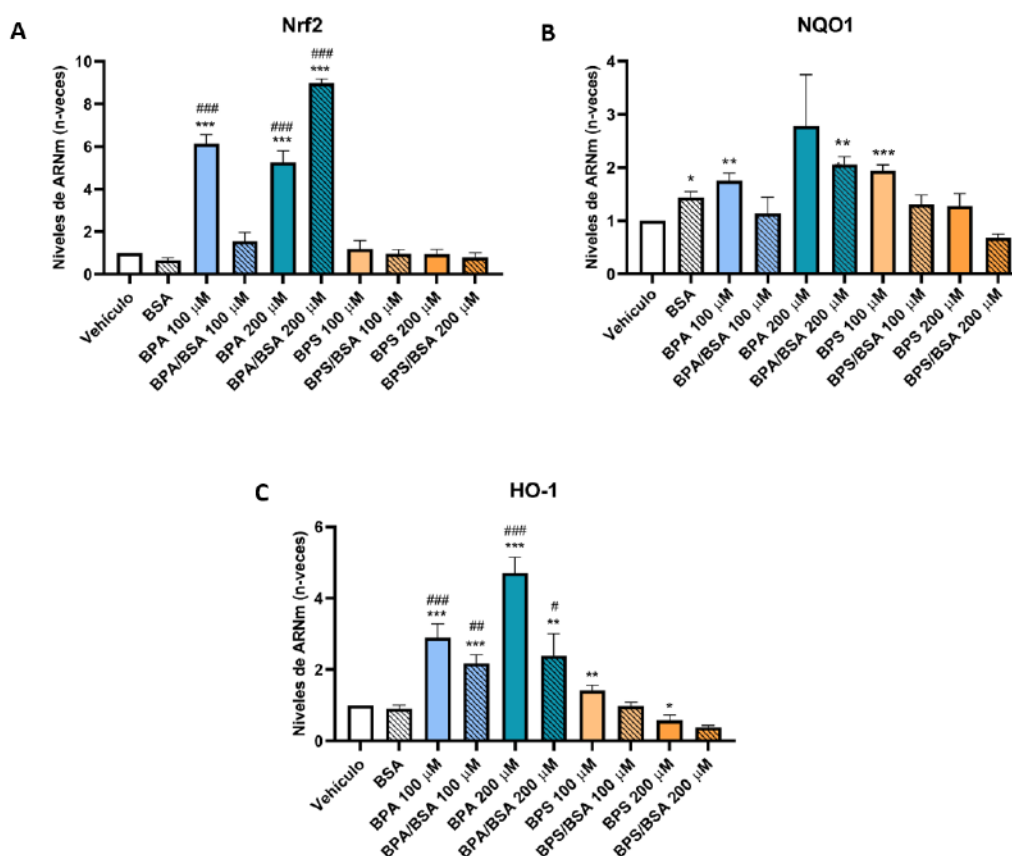
### 3.3 La estimulación con BPS produce una menor respuesta oxidativa en comparación con el BPA en células epiteliales del túbulo proximal renal humano en cultivo

Otra de las vías objeto de estudio para comparar los efectos ocasionados por el BPS y el BPA fue el estrés oxidativo. Para ello, evaluamos la vía de señalización celular Nrf2, principal regulador protector a la respuesta de estrés oxidativo, mediante la expresión génica de Nrf2 y sus genes diana, como NQO1 y HO-1 por qPCR en tiempo real. Para realizar dichos experimentos,



las células fueron tratadas con BPS y BPA a diferentes concentraciones de 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M, en ausencia y presencia de BSA durante 6 horas.

Los resultados obtenidos demostraron cómo la estimulación con BPA produjo un incremento significativo de la expresión génica de Nrf2, así como su diana HO-1, a ambas concentraciones en comparación con los grupos control. Sin embargo, la estimulación con BPS no ocasionó un incremento en la expresión génica de Nrf2 ni de sus genes diana, incluso a las concentraciones más elevadas estudiadas (Figura 37). Estos datos sugieren que la estimulación con BPS en las células tubuloepteliales renales humanas no promueve la activación de la vía antioxidante Nrf2 y, por lo tanto, no se genera un desequilibrio redox tan pronunciado como el observado por la estimulación con BPA.



**Figura 37. La estimulación con BPS no induce la expresión génica de Nrf2 ni de sus genes diana NQO1 y HO-1 en cultivo celular, en comparación con el BPA que sí produce su inducción.** El cultivo se realizó con células tubuloepteliales renales humanas (línea HK2), las cuales se incubaron con BPS o BPA a diferentes concentraciones (100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M) durante 6 horas, en ausencia o presencia de BSA. La expresión de (A) Nrf2, (B) NQO1 y (C) HO-1 se determinó por qPCR en tiempo real. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  vs Vehículo; \*\*  $p < 0,01$  vs Vehículo; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Vehículo; #  $p < 0,01$  vs BSA. ###  $p < 0,001$  vs BSA.



## 4. Estudio agudo y crónico de los niveles plasmáticos de BPS como alternativa segura al BPA en pacientes con ERCT

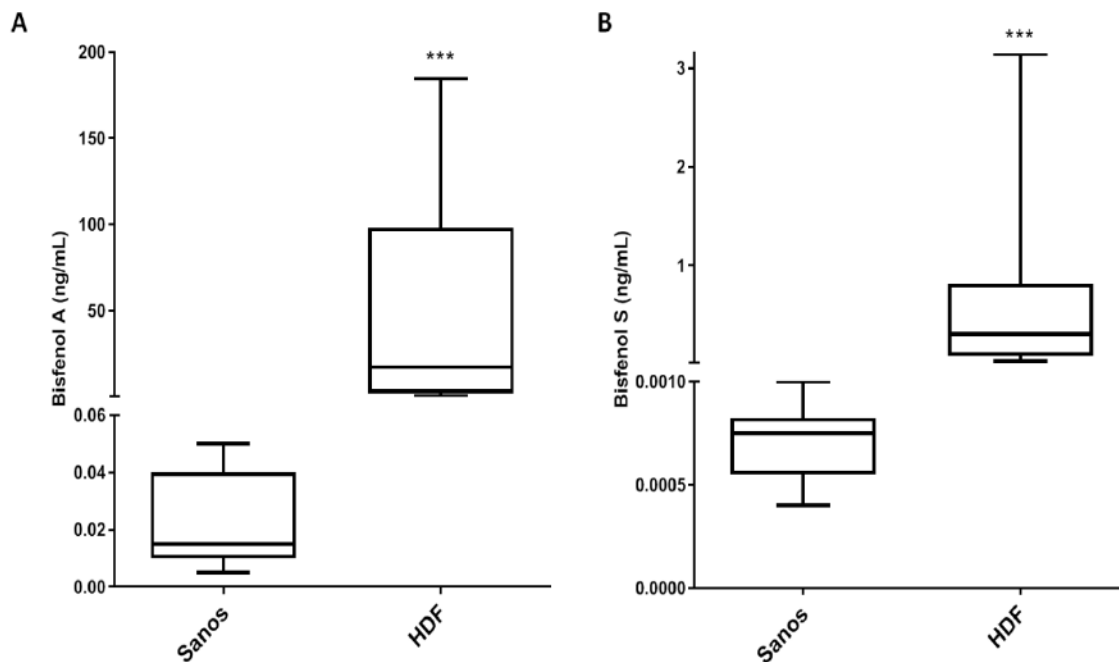
Como se ha comentado en la *Introducción*, el BPS es un componente de las membranas utilizadas en los dializadores, formando parte junto con el BPA de las membranas de polisulfona (PS), siendo esta la más utilizada en diálisis. Además, el BPS es el mayor componente en las membranas de dializadores alternativos como la membrana de polinefrona (PN), ya que no contiene BPA. Por ello, y por analogía con el BPA, quisimos evaluar si los pacientes en hemodiálisis podrían estar expuestos a dicha molécula durante las sesiones de diálisis como resultado de su eliminación por parte de la membrana de diálisis y su acumulación en el organismo por la ausencia de eliminación urinaria. Por lo tanto, evaluamos las concentraciones circulantes de BPS en pacientes con ERCT, puesto que en la literatura existe muy poca información sobre los efectos de esta molécula, especialmente en estos pacientes, y se compararon con los niveles de BPA.

### 4.1. Comparativa entre los niveles plasmáticos de BPA y BPS en pacientes con ERCT y población sana

En primer lugar, evaluamos las concentraciones plasmáticas de BPS y BPA en 10 pacientes sanos y en 14 pacientes con ERCT, sometidos una semana a HDF con membranas de triacetato de celulosa en el estudio agudo. De los pacientes sanos, siete de ellos presentaron niveles de BPS inferiores al límite de detección del ensayo (0,05 ng/ml, 1ppb), siendo el rango de los que se pudo medir entre 0,05-0,07 ng/ml, mientras que en los pacientes en HDF, los niveles plasmáticos de BPS pre-diálisis fueron 0,54 ng/ml, obteniendo diferencias significativas de los niveles plasmáticos de BPS entre pacientes sanos y pacientes en HDF (Figura 38).

Por otro lado, las determinaciones de las concentraciones plasmáticas de BPA en los pacientes en HDF fueron de 13,23 ng/ml mientras que la de los pacientes control fueron de 0,37 ng/ml, produciéndose un incremento significativo en las concentraciones plasmáticas de BPA en comparación con el grupo control (Figura 38).

También podemos observar cómo los valores plasmáticos de BPS son significativamente menores comparados con los de BPA, entre pacientes sanos y pacientes en HDF (Figura 38 y Tabla 9).



**Figura 38. Estudio agudo.** Concentración plasmática de BPA y BPS en pacientes con ERCT en pacientes en HDF y pacientes sanos. **(A)** Concentración plasmática de BPA representada mediante boxplot. **(B)** Concentración plasmática de BPS representada mediante boxplot. \*\*\* $p < 0,001$  vs Sanos.

**Tabla 9.** Resumen de los valores obtenidos en la determinación de las concentraciones plasmáticas de BPA y BPS. Muestra significancia dentro de cada grupo (Sanos BPA vs Sanos BPS; HDF BPA vs HDF BPS).

Grupo	Concentración (ng/mL)	Significancia
Sano BPA	$0,37 \pm 0,12$	$p < 0,001$
Sano BPS	$0,05 \pm 0,07$	
HDF BPA	$13,23 \pm 14,65$	$p < 0,001$
HDF BPS	$0,54 \pm 0,52$	

#### 4.2. El dializador PS contiene mayor concentración de bisfenoles en comparación con el dializador PN

La fuente de bisfenoles en los pacientes en diálisis puede provenir del ambiente, pero también de la liberación de estas moléculas de los componentes del sistema de diálisis, más concretamente de las membranas de los dializadores. Para ello, quisimos evaluar si había alguna liberación de estas moléculas procedente de la fibra de los dializadores. En un primer análisis no se observó la presencia de BPA o BPS libre en las fibras de los dializadores de PN o PS. Sin

embargo, la incubación de las fibras de los dializadores bajo condiciones fisiológicas (37°C en medio de cultivo) durante 24 horas permitió la detección cuantificable de ambas moléculas. En las fibras de PN se consiguió determinar concentraciones de 100 ng/ml de BPS en 10 mg de fibras, mientras que en las fibras de PS se determinaron concentraciones de BPS de 1.960 ng/ml y 8.060 ng/ml de BPA en 10 mg de fibras. Por lo tanto, las fibras de PS liberan ambas moléculas (BPA y BPS) y a mayor concentración que las fibras de PN, que solo liberan BPS bajo condiciones fisiológicas.

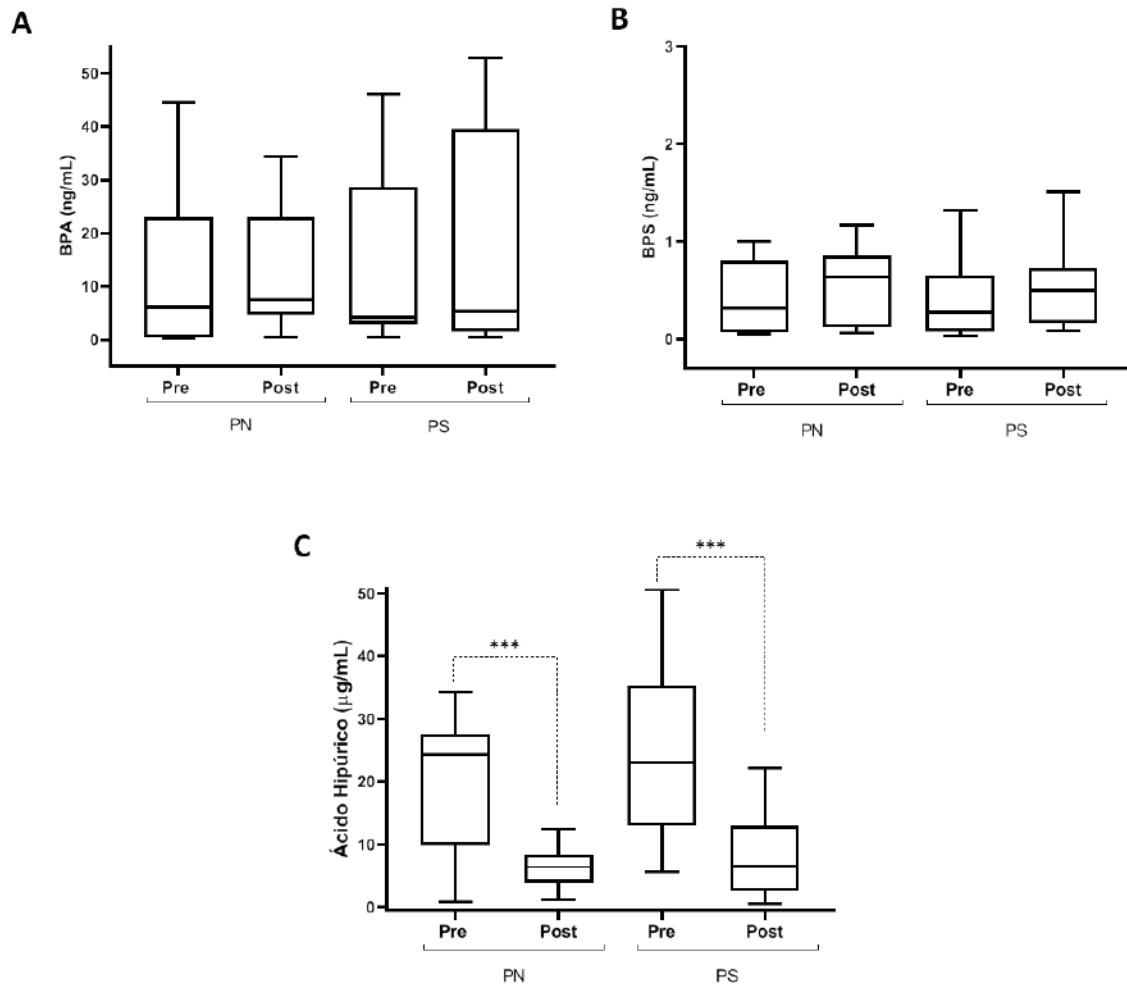
**Tabla 10.** Resumen de la cuantificación de BPA y BPS en cada dializador.

TIPO DE DIALIZADOR			
Polinefrona (PN; 10 mg)		Polisulfona (PS; 10 mg)	
BPA	BPS	BPA	BPS
-----	100 ng/ml	8.060 ng/ml	1.960 ng/ml

#### *4.3. La concentración plasmática de BPS no varía en el estudio agudo de pacientes en HDF y no interfiere el tipo de membrana de diálisis (PN o PS)*

Una vez determinado que los pacientes con ERCT tenían concentraciones de BPA y BPS superiores a la población sana, quisimos evaluar mediante un estudio agudo si las concentraciones plasmáticas de BPA y BPS variaban según el tipo de dializador (PN o PS) cuando se utilizaba el mismo durante toda una semana. Posteriormente, se cambiaría al otro dializador y se volverían a realizar las mismas determinaciones, para así observar si la acumulación de ambas moléculas era debida a la utilización de uno u otro dializador. Adicionalmente, se compararon los valores obtenidos con otra toxina urémica de similar peso molecular (179 g/mol vs 228 g/mol) y con características hidrofóbicas similares, como es el ácido hipúrico. En cuanto a los dializadores estudiados, el dializador de PN es libre de BPA pero contiene BPS, mientras que el dializador de PS contiene ambas moléculas BPA y BPS.

Como se puede observar en la Figura 39 y Tabla 11, las concentraciones plasmáticas de BPA no sufrieron cambios significativos en función del dializador utilizado en una sola sesión de diálisis. Por otro lado, las concentraciones plasmáticas de BPS tampoco sufrieron cambios significativos en función del dializador, aunque sí se observa cierta tendencia a incrementar sus valores después de las sesiones de diálisis independientemente del dializador (Figura 39, Tabla 12). Por último, las determinaciones plasmáticas del ácido hipúrico, toxina urémica bien caracterizada en su eliminación por diálisis, se redujeron significativamente después de la sesión de diálisis en ambos dializadores (Figura 39).



**Figura 39. Estudio agudo.** Análisis de la concentración plasmática en pacientes en HDF usando diferentes membranas de dializador (PN: polinefrona; PS: polisulfona). Concentraciones plasmáticas de BPA (A), BPS (B), y ácido hipúrico (C).

**Tabla 11.** Concentración plasmática de BPA antes y después de la sesión de diálisis HDF usando diferentes membranas utilizando la misma membrana durante una semana.

	<i>BPA (ng/ml)</i>	
	<i>Media ± DS</i>	<i>Mediana (IQR)</i>
<i>PN pre-diálisis</i>	11,51 ± 13,55	6,12 (19,86)
<i>PN post-diálisis</i>	12,42 ± 11,10	7,54 (15,98)
<i>PS pre-diálisis</i>	13,17 ± 14,81	4,27 (23,41)
<i>PS post-diálisis</i>	15,83 ± 19,25	5,31 (30,68)

**Tabla 12.** Concentración plasmática de BPS antes y después de la sesión de diálisis HDF usando diferentes membranas utilizando la misma membrana durante una semana.

	<i>BPS (ng/ml)</i>	
	<i>Media ± DS</i>	<i>Mediana (IQR)</i>
<i>PN pre-diálisis</i>	0,42 ± 0,35	0,32 (0,65)
<i>PN post-diálisis</i>	0,56 ± 0,36	0,64 (0,68)
<i>PS pre-diálisis</i>	0,59 ± 0,82	0,30 (0,61)
<i>PS post-diálisis</i>	0,58 ± 0,47	0,51 (0,37)

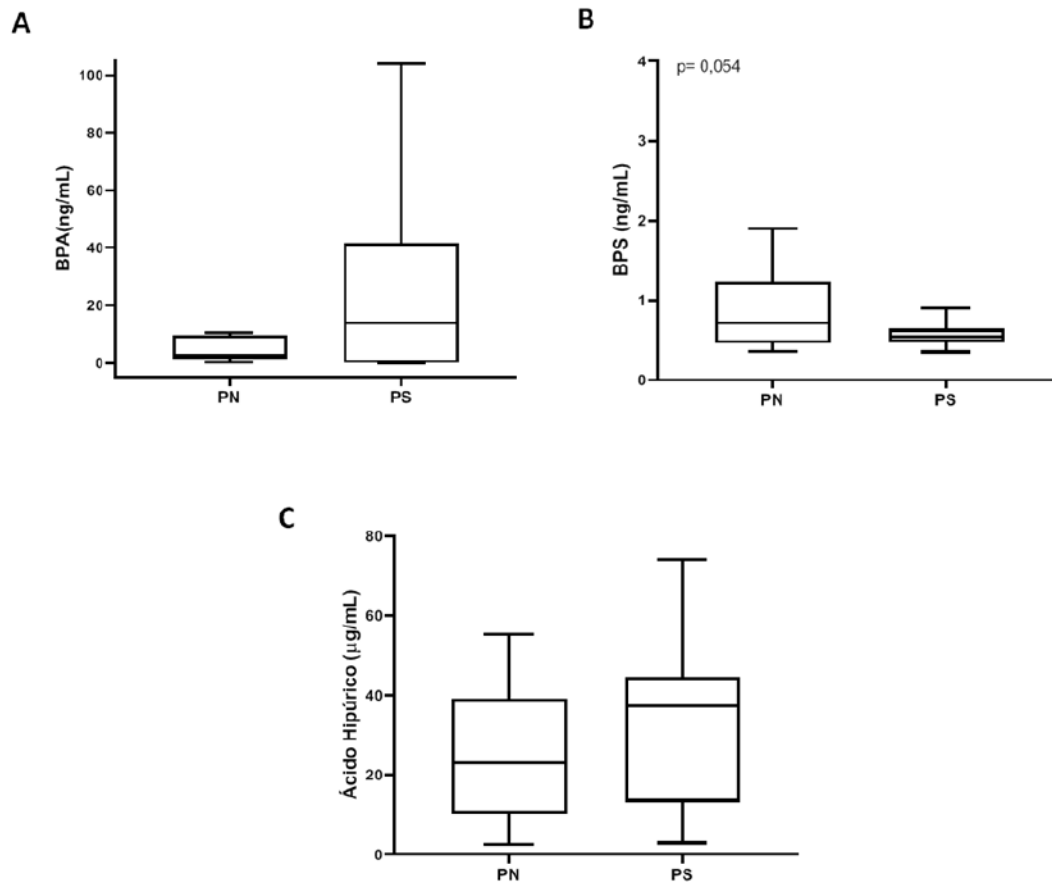
#### 4.4. Mayor bioacumulación de los niveles plasmáticos de BPA en comparación con los de BPS en el estudio crónico con pacientes con ERCT

Ante los resultados obtenidos, quisimos evaluar la potencial bioacumulación del BPS durante un periodo largo en diálisis en HDF. Para ello, realizamos un estudio crónico (detalles experimentales *Materiales y métodos*), en el cual se analizaron las concentraciones plasmáticas de BPA y BPS en pre-diálisis después de 3-6 meses usando la misma membrana de diálisis (PN o PS). En este caso, también realizamos las determinaciones de ácido hipúrico.

Los resultados obtenidos por espectrometría de masas no indicaron cambios significativos entre los niveles plasmáticos de BPA comparados entre los dializadores PS y PN a largo plazo (Figura 40). No obstante, sí podemos observar una tendencia en la bioacumulación de BPA en los dializadores PS en comparación con el dializador PN, hecho que nos hace indicar que podría darse una bioacumulación en el organismo de BPA a mayor plazo de uso de este dializador.

Por otro lado, la evaluación de los niveles plasmáticos de BPS por espectrometría de masas tampoco reveló cambios significativos entre los dializadores PS y PN a largo plazo de uso (Figura 40). Por último, la evaluación de ácido hipúrico tampoco reveló cambios en la acumulación de dicha toxina urémica, hecho que presuponíamos.





**Figura 40. Estudio crónico.** Análisis de la concentración plasmática en pacientes en HDF usando diferentes membranas de dializador (PN: Polinefrona; PS: Polisulfona). Concentraciones plasmáticas de BPA (A), BPS (B) y ácido hipúrico (C).

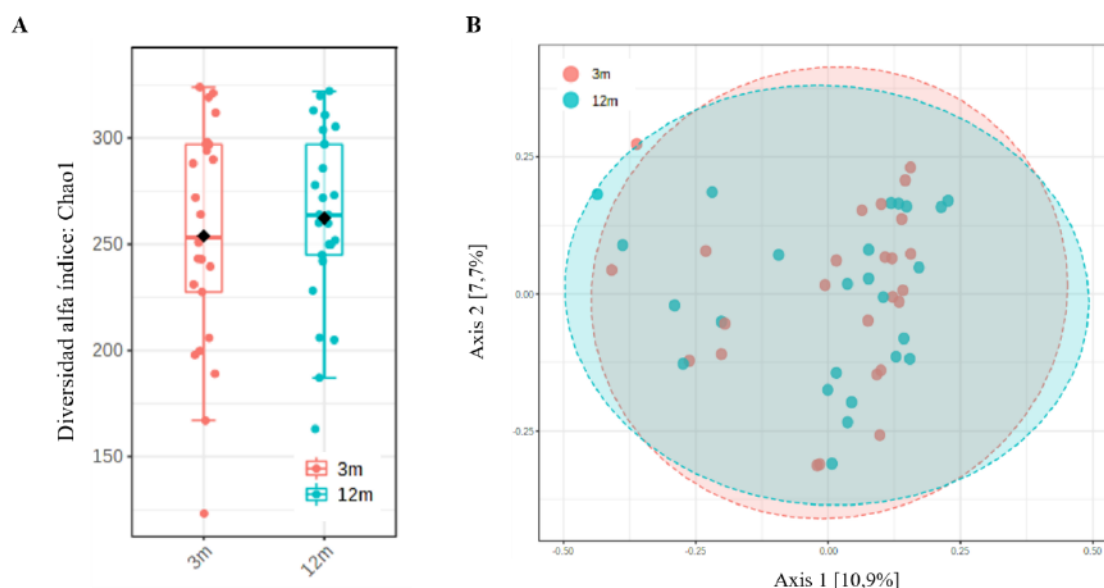
Con los resultados obtenidos, podemos observar cómo la utilización a largo plazo de los dializadores no ha mostrado diferencias significativas entre ambos en las concentraciones de los tres solutos. Sin embargo, tanto para el BPA como el BPS, sí se observan tendencias a dicha acumulación dependiendo del tipo de dializador, observándose una acumulación del BPA 25 veces mayor que BPS en los dializadores de PS, y 4 veces mayor en los dializadores de PN.

## 5. Evaluación de la modificación de la microbiota sobre las toxinas urémicas en el paciente con enfermedad renal crónica

Los análisis se llevaron a cabo comparando el inicio del estudio en el mes 3 y el fin del estudio en el mes 12 después de haber estado nueve meses con la toma del probiótico.

### 5.1. Efecto de la ingesta de probiótico (*Vivomixx*) durante 9 meses en la diversidad de la microbiota intestinal de pacientes con enfermedad renal crónica

En primer lugar, evaluamos la composición de las comunidades bacterianas de los pacientes a los 3 meses y 12 meses calculando la diversidad alfa, que hace referencia a la biodiversidad intrínseca de cada muestra, y la diversidad beta, que indica el grado de cambio en la composición taxonómica entre diferentes comunidades bacterianas. En cuanto a la diversidad alfa, los pacientes a los 3 meses mostraron menos riqueza estimada (índice Chao1) que a los 12 meses después de la ingesta del probiótico, aunque sin diferencias significativas entre los grupos (Figura 41A). A continuación, estimamos la diversidad beta de la microbiota intestinal de los pacientes a los 3 y 12 meses, observando disimilitudes de Bray-Curtis entre ambos tiempos, pero sin revelar diferencias significativas (Figura 41B).

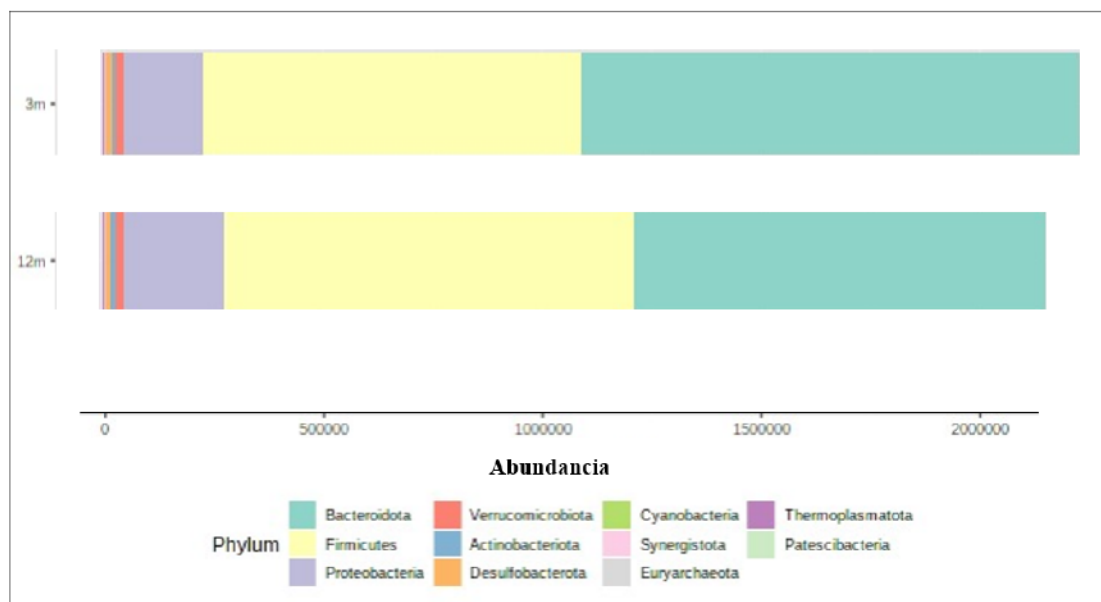


**Figura 41. Índices de diversidad entre los grupos 3 meses y 12 meses. A) Índice de diversidad alfa. B) Índice de diversidad beta.**

Aunque no se hayan observado diferencias significativas en ambos análisis, si se observa un cambio de tendencia en la diversidad y composición de la microbiota intestinal después de 9 meses con probióticos.

## 5.2. Efecto de la ingesta de probiótico (Vivomixx) durante 9 meses en la composición de la microbiota intestinal de pacientes con enfermedad renal crónica

Otro de los análisis realizados fue observar si había diferencias en la composición taxonómica de la microbiota intestinal entre los pacientes a 3 y 12 meses. En cuanto a los filos más abundantes se pueden observar diferencias en la composición entre ambos grupos (Figura 42, Tabla 13).



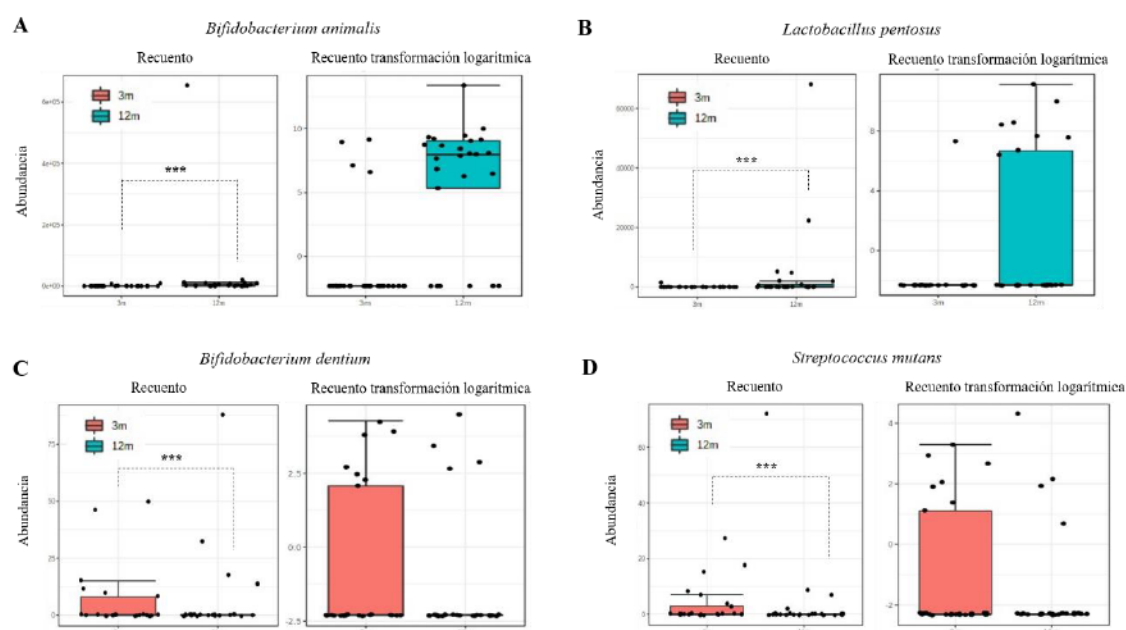
**Figura 42.** Comparación de la composición de la microbiota intestinal entre los diferentes grupos a nivel de filo.

**Tabla 13.** Porcentaje de distribución en la composición de la microbiota intestinal entre los diferentes grupos a nivel de filo.

<i>Filo</i>	<i>3 meses</i>	<i>12 meses</i>
Bacteroidota	51%	44%
Firmicutes	39%	44%
Proteobacteria	8%	11%
Otros filos	<2%	<1%

Dentro de los filos, los más abundantes fueron *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Proteobacteria* (Tabla 13), que compusieron alrededor del 98% de las bacterias identificadas, pudiéndose observar diferencias en algunos de estos filos después de la ingesta de probióticos (Figura 42, Tabla 13). Además, a los 3 meses el grupo más representativo fue *Bacteroidota*, mientras que a los 12 meses el filo más abundante fue *Firmicutes* (Figura 42, Tabla 13). La relación *Firmicutes/Bacteroidota* es utilizada como un indicador de disbiosis. A los 12 meses después de la ingesta del probiótico, *Firmicutes* aumentó y *Bacteroidetes* disminuyó, con respecto a los 3 meses, indicando una mejora en la disbiosis de estos pacientes. En cuanto al filo *Proteobacteria*, se observó un incremento después de la ingesta de probióticos (Figura 42, Tabla 13).

Consistentemente, los cambios observados en el filo son extensibles a niveles más bajos de jerarquía en la taxonomía. Las muestras de los pacientes a los 12 meses muestran incrementos significativos en las especies *Bifidobacterium animalis* y *Lactobacillus pentosus*, presentes ambas cepas en el probiótico y capaces generar un microambiente saludable en el paciente gracias por ejemplo a la producción de ácidos grasos de cadena corta y favorecer un ambiente antiinflamatorio (Figura 43). Por otro lado, se produjo la disminución de las especies *Bifidobacterium dentium*, una de las principales fuentes de infecciones anaeróbicas, y *Streptococcus mutans*, incrementados en ambientes de disbiosis intestinal, en las muestras a 12 meses mejorando así la microbiota intestinal (Figura 43).



**Figura 43. Especies significativamente diferentes entre los diferentes grupos. A)** Comparación de abundancia de la especie *Bifidobacterium animalis* entre los 3 y 12 meses. **B)** Comparación de abundancia de la especie *Lactobacillus pentosus* entre los 3 y 12 meses. **C)** Comparación de abundancia de la especie *Bifidobacterium dentium* entre los 3 y 12 meses. **D)** Comparación de abundancia de la especie *Streptococcus mutans* entre los 3 y 12 meses. \*\*\*  $p < 0,001$  vs 3 meses.

Por lo tanto, los datos obtenidos muestran que la modificación de la microbiota intestinal después de nueve meses con la toma del probiótico fue beneficiosa al incrementarse cepas bacterianas que disminuyen la disbiosis de los pacientes renales, e incrementarse la relación *Firmicutes/Bacteroidetes*.

### *5.3. Efecto de la ingesta de probiótico (Vivomixx) durante 9 meses en la producción de toxinas urémicas en pacientes con enfermedad renal crónica*

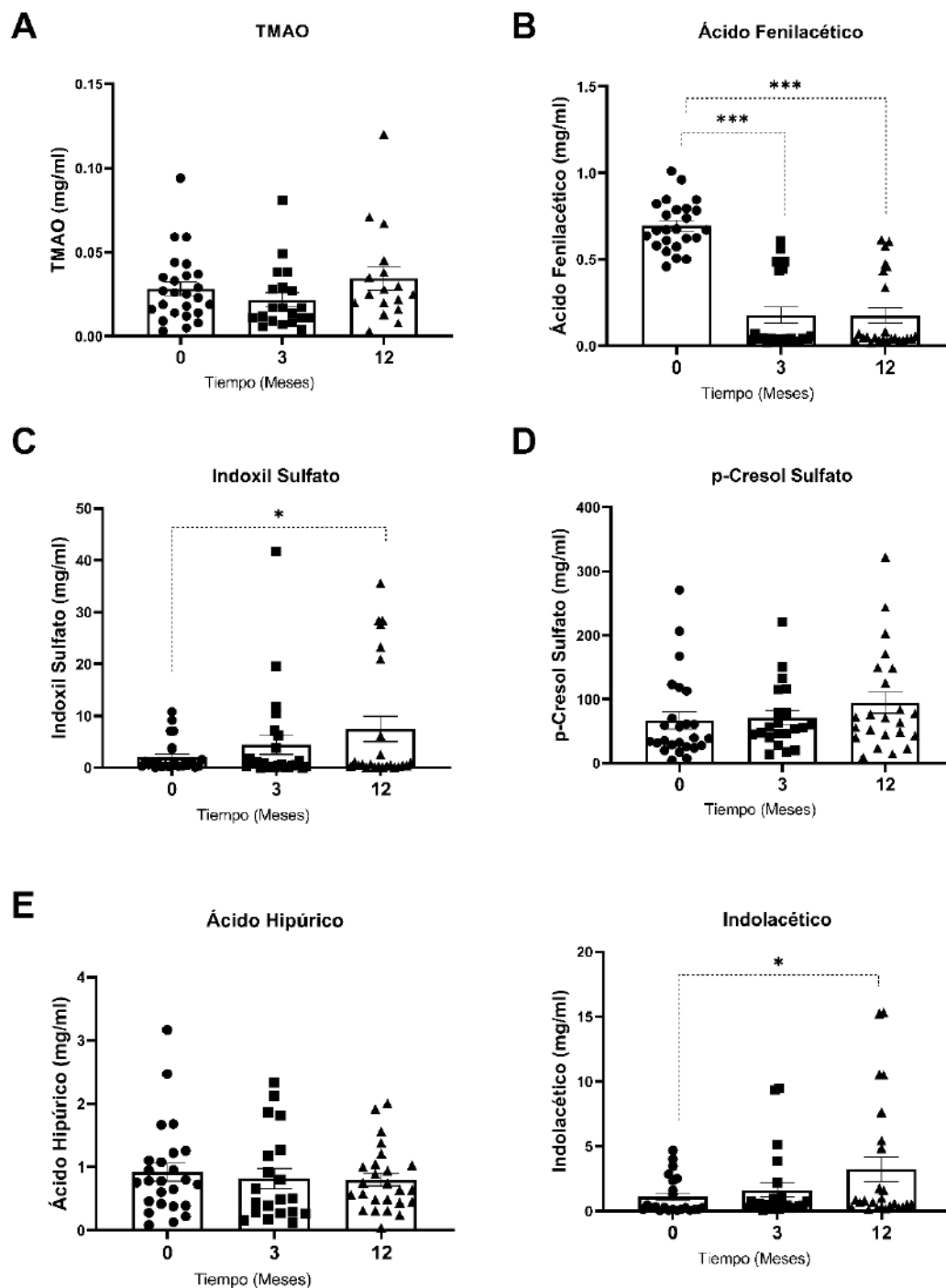
Una vez obtenidos los resultados de la microbiota intestinal, y observar que había habido modificaciones a los 12 meses mediante la ingesta de probióticos, quisimos evaluar las concentraciones plasmáticas de las toxinas urémicas producidas en los pacientes durante todo el estudio. Las toxinas urémicas evaluadas fueron: TMAO, p-cresol sulfato (pCS), indoxil sulfato (IS), ácido fenilacético, ácido hipúrico e indolacético mediante espectrometría de masas. Las toxinas evaluadas son las más representativas en la enfermedad renal crónica, relacionadas con la progresión de la enfermedad.

Como podemos observar las toxinas urémicas TMAO, pCS y ácido hipúrico no sufrieron modificaciones significativas ni a los 3 meses, ni después de los 12 meses después de la ingesta de probióticos durante 9 meses. Por otro lado, sí se produjo un incremento significativo en las toxinas urémicas IS e indolacético a los 12 meses en comparación con el inicio del estudio, aunque también se observa un incremento, no significativo, en las muestras de los pacientes a 3 meses. Sin embargo, sí se observó una disminución significativa en las muestras de 3 meses y 12 meses en comparación con las muestras iniciales (Figura 44).

Por lo general, podemos destacar que la implementación de la ingesta del probiótico durante 9 meses no incremento la producción de toxinas urémicas, es más, se podría resaltar la estabilización sistémica de estas toxinas en el organismo, retrasando así en cierto modo la progresión de la enfermedad renal crónica durante los meses de ingesta.

Finalmente, en cuanto a los resultados analíticos no se observan cambios significativos en ninguno de los valores determinados, es decir, todos los pacientes del estudio presentaron analíticas similares al principio y final del estudio (Tabla 14).





**Figura 44. Representación de la concentración plasmática de las principales toxinas urémicas en el paciente con ERC e intervención con probiótico. (A) Concentración plasmática de TMAO (mg/ml). (B) Concentración plasmática de Ácido Fenilacético (mg/ml). (C) Concentración plasmática de Indoxil Sulfato (mg/ml). (D) Concentración plasmática de p-Cresol Sulfato (mg/ml). (E) Concentración plasmática de Ácido Hipúrico (mg/ml). (F) Concentración plasmática de Indolacético.**

Tabla 54. Impacto de la ingesta de probióticos en análisis bioquímico

	Mes 0	Mes 3	Mes 12
	<i>Media</i>	<i>Media</i>	<i>Media</i>
Hemoglobina (%)	13,17 ± 1,57	13,13 ± 1,59	14,24 ± 6,21
Glucemia (mg/dl)	110,58 ± 27,46	118,44 ± 30,97	114,74 ± 27,14
Urea (mg/dl)	79,81 ± 31,41	78,19 ± 32,36	86,89 ± 41,37
Creatinina (mg/dl)	1,77 ± 0,58	2,02 ± 0,91	2,24 ± 1,42
CKD-Epi	38,50 ± 15,76	35,91 ± 17,18	33,89 ± 16,10
Albúmina (g/dl)	4,37 ± 0,28	4,39 ± 0,22	4,37 ± 0,31
Ca (mg/dl)	9,23 ± 0,36	9,46 ± 0,30	9,44 ± 0,38
P (mg/dl)	3,44 ± 0,64	3,54 ± 0,55	3,60 ± 0,60
Mg (mg/dl)	1,62 ± 0,63	1,65 ± 0,61	1,65 ± 0,63
Ferritina (ng/ml)	150,39 ± 106,16	166,97 ± 114,18	147,67 ± 78,47
Sat transferrina (%)	24,98 ± 8,01	24,97 ± 7,15	27,31 ± 6,58
Colesterol total (mg/dl)	164,65 ± 37,56	177,27 ± 68,20	168,23 ± 40,25
Colesterol LDL	80,70 ± 30,08	81,15 ± 33,95	81,99 ± 32,28
Colesterol HDL	53,13 ± 11,87	49,97 ± 16,52	54,78 ± 13,47
Triglicéridos (mg/dl)	139,83 ± 67,88	163,59 ± 77,21	159,17 ± 96,55
25OHD (ng/ml)	23,91 ± 10,98	24,27 ± 7,99	23,98 ± 10,26
PCR (mg/dl)	2,11 ± 3,04	2,80 ± 3,87	1,20 ± 2,05
PTH	102,29 ± 76,54	105,26 ± 76,72	123,60 ± 144,33
Na (mmol/L)	141,17 ± 2,13	141,38 ± 2,41	141,39 ± 3,27
K (mmol/L)	4,79 ± 0,44	4,83 ± 0,42	4,77 ± 0,41
pH	7,34 ± 0,03	7,34 ± 0,03	6,93 ± 1,40
Bic	27,48 ± 2,63	27,34 ± 3,19	27,38 ± 2,40
VSG (mm/h)	32,77 ± 27,13	34,14 ± 21,58	21,47 ± 12,07

## DISCUSIÓN

---

## 1. Efecto del bisfenol A sobre la enfermedad renal crónica

En los últimos años, se ha observado BPA en el organismo en la mayoría de la población humana debido principalmente a una mayor exposición a esta molécula por su gran uso en la industria para la síntesis de plásticos policarbonatos y resinas epoxi.<sup>135</sup> También se ha detectado la presencia de BPA en aguas subterráneas o ríos.<sup>207, 208</sup> Así pues, el BPA es considerado una molécula ubicua en el mundo. En relación con su metabolismo, cabe destacar que la eliminación del BPA en humanos se realiza principalmente a través de la orina,<sup>138, 139</sup> por lo que nuestro grupo decidió estudiar el BPA como una posible sustancia tóxica exógena para la población con enfermedad renal crónica, ya que observamos que en estos pacientes los niveles de BPA estaban incrementados.<sup>182, 201</sup> Anteriormente, en nuestro grupo de investigación, se evaluaron los efectos del BPA en ensayos *in vitro*, observando cómo esta molécula es capaz de producir daño mitocondrial, mediante el incremento en la despolarización de la membrana mitocondrial, interrupción en la producción de ATP e incremento del estrés oxidativo en células del túbulo epitelial humanas.<sup>155</sup>

Por otro lado, debido a que el BPA es considerado un disruptor endocrino y activador de receptores estrogénicos  $\alpha$  y  $\beta$  (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ),<sup>145</sup> los principales estudios recogidos en la literatura fueron dirigidos hacia la acción de esta molécula sobre el desarrollo y la reproducción, describiendo cómo esta es capaz de influir en la maduración de los espermatozoides y el desarrollo embrionario.<sup>148, 151</sup> También ha sido descrito que el BPA es capaz de influir en la inflamación y la respuesta inmunitaria mediante la alteración de diversas células inmunitarias, como los linfocitos B y macrófagos.<sup>150</sup>

Por todo ello, nos pareció interesante continuar evaluando la potencial toxicidad del BPA en experimentos *in vitro* e *in vivo* en el riñón, ya que los resultados procedentes de otros estudios hacían indicar que podría empeorar la progresión de la ERC, al igual que ocurre con las toxinas urémicas.

En primer lugar, en la literatura ha sido documentado el papel del BPA en la inducción de estrés oxidativo.<sup>152, 153, 155, 157</sup> En estudios *in vitro*, se ha observado que la estimulación con BPA en células epiteliales renales de embrión de mono rhesus (Marc-145) puede promover la inducción de estrés oxidativo debido al incremento de los niveles de ROS y contenido de malondialdehído (MDA).<sup>209</sup> Este hecho también se ha descrito en espermatozoides y mitocondrias de testículos de ratón,<sup>210, 211</sup> así como en células de cáncer de mama MCF-7.<sup>212</sup> De manera similar, en modelos *in vivo* la exposición crónica de BPA produjo incremento de ROS y de actividad de mieloperoxidasas en testículos de rata.<sup>213</sup> En otro estudio sobre la exposición de BPA en colon e hígado de ratones, los autores observaron la misma disregulación del



equilibrio redox celular mediante el incremento en los niveles de ROS (principalmente en la producción de ROS mitocondrial), RNS o MDA.<sup>214</sup>

En estudios previos del laboratorio, se constató que la estimulación de BPA en células túbulo epiteliales humanas produjo daño mitocondrial, causado por un incremento en la despolarización de la membrana mitocondrial, y una interrupción en la producción de ATP. El BPA también produjo el incremento de estrés oxidativo a través de la producción de ROS dependientes de NADPH oxidasa. Otra de las evidencias encontradas fue la elevada inducción de defensas antioxidantes promovidas por la estimulación con BPA, como la vía Nrf2 y sus genes diana de transcripción, tales como HO-1 y NQO1. Este hecho podría limitar la toxicidad del BPA, pero sin embargo hace que las células dependan de la activación continua de las defensas antioxidantes y ante cualquier factor ambiental, ya sea la inflamación o toxinas urémicas, puede que se comprometa esta vía antioxidante y se desencadene un incremento de la toxicidad.<sup>155</sup>

Los experimentos *in vivo* realizados en esta tesis en el modelo de ERC, muestran cómo la administración de BPA, tanto a 2 y 5 semanas, produjo un incremento en la expresión génica y proteica de Nrf2, así como de sus genes diana HO-1 y NQO1. Además, en los animales con función renal normal, la administración de BPA no ocasionó cambios de manera tiempo dependientes en cuanto a la expresión génica de Nrf2, HO-1 o NQO1. Por el contrario, la expresión proteica de dichas proteínas sí se vio modificada de manera tiempo dependiente, siendo superior cuanto mayor fue el tiempo de exposición de BPA. Por otro lado, parece que la presencia de BPA, junto con una función renal comprometida, induce la expresión génica exacerbada de los anteriores genes, lo cual podría indicar que están sufriendo un mayor desajuste redox, produciéndose así un incremento de estrés oxidativo. Como observamos en los experimentos *in vitro*, es posible que el BPA también esté influyendo en la disfunción mitocondrial renal, contribuyendo así al incremento de ROS y, por ende, a la activación de la vía antioxidante Nrf2. Como se ha comentado en la *Introducción*, el estrés oxidativo es capaz de producir la activación de la vía NF- $\kappa$ B,<sup>58, 59</sup> y el BPA puede estimular la activación de este factor de transcripción y de otro factor de transcripción como STAT3 mediante la activación de la vía ERK y fosforilación de JAK1/2 respectivamente.<sup>215</sup> De esta manera, se produce la activación de factores de transcripción proinflamatorios y se incrementa la expresión de mediadores inflamatorios, como IL-6, CCL2,<sup>216</sup> favoreciendo así un incremento en la activación y reclutamiento de las células inmunes.

Otro de los mecanismos estudiados en esta tesis es la autofagia, debido a que en el riñón adulto es crucial para el mantenimiento de la integridad y fisiología normal renal en las células que componen este órgano (podocitos, células túbulo epiteliales proximales, células mesangiales glomerulares y células endoteliales glomerulares).<sup>217</sup> Por ejemplo, en estudios *in vitro* en células mesangiales glomerulares se muestra cómo la autofagia regula la eliminación de colágeno <sup>218</sup> y

es citoprotectora en respuesta a la privación de suero.<sup>219</sup> Además, ratones KO para la autofagia específica del túbulo proximal presentaron acumulación de mitocondrias dañadas o deformadas, agregados de proteína mal plegadas y exhibieron un incremento de apoptosis en células del túbulo proximal.<sup>220</sup> En estos mismos ratones a 24 meses de edad, se observaron múltiples características de senescencia celular, incluyendo la pérdida de función renal, daño mitocondrial, daño en el DNA nuclear y fibrosis, en comparación con ratones salvajes.<sup>221</sup> Adicionalmente, Peng y col. observaron que la delección del gen *ATG5* en células túbulo epiteliales proximales renales promovió la expresión de citoquinas proinflamatorias e infiltración de leucocitos, mientras que su sobreexpresión inhibió la respuesta inflamatoria de manera dependiente de autofagia mediante el bloqueo de NF- $\kappa$ B.<sup>222</sup>

Por otro lado, en modelos animales de enfermedad renal como UUO se observó una inducción de autofagia dependiente de tiempo, acompañada por atrofia tubular, muerte celular y fibrosis intersticial.<sup>223</sup> En este mismo estudio, la utilización del inhibidor 3 metiladenina (3MA) incrementó la apoptosis tubular y fibrosis intersticial en los riñones obstruidos. Además, estudios asociados al modelo experimental UUO y ratones LC3 y Beclin KO revelaron incrementos en la deposición de colágeno acompañados por incrementos en los niveles de TGF- $\beta$  en los riñones obstruidos.<sup>76</sup> En otro trabajo, en el que se empleaba el modelo de nefrectomía 5/6, se describió que el factor 2 de osteoblastos (perostina), que desempeña un papel como factor profibrótico y proinflamatorio,<sup>224</sup> estaba incrementado en los riñones, así como el flujo de autofagia estaba alterado. La eliminación de perostina promovió la protección contra la activación del sistema renina-angiotensina intrarrenal inducido por este modelo, mejorando la fibrosis, inflamación y flujo de autofagia,<sup>225</sup> sugiriendo así que la autofagia alterada estaba involucrada en la inflamación y la fibrosis.

Los estudios realizados en esta tesis sugieren que el BPA podría estar alterando el flujo de autofagia en la enfermedad renal, siendo capaz de influir en el incremento de la respuesta inflamatoria y fibrosis. En estudios *in vitro*, se observó que la exposición a BPA en células túbulo epiteliales renales humanas produjo un bloqueo en el flujo de la autofagia mediante el incremento de la expresión de dos proteínas claves en esta vía, LC3II y p62/SQSTM1, de la misma forma que aumentó la del inhibidor de autofagia 3MA. Durante el proceso autofágico, LC3II cambia su dinámica e incrementa sus niveles proteicos, lo que indica una acumulación de autofagosomas.<sup>226</sup> Por su parte, p62/SQSTM1 es considerado el marcador por excelencia de la degradación autofágica y su acumulación representa un sello distintivo de autofagia bloqueada o deteriorada.<sup>227</sup> Este hecho también ha sido descrito por Yang y col., que observaron cómo la exposición de BPA en células hepáticas HepG2 incrementó la expresión de ambas proteínas y, por consiguiente, ocasionó la desregulación del flujo autofágico.<sup>228</sup>

A continuación, los experimentos realizados *in vivo* en esta tesis, el modelo de nefrectomía 5/6 y exposición a BPA, constatan los resultados obtenidos previamente en el cultivo celular, en los cuales describimos que la administración de BPA provoca un aumento en la expresión de genes relacionados con la autofagia, como *LC3*, *Beclin*, *ATG5* o *ATG7*, siendo superior dicha expresión cuando existe una disfunción renal previa. Por otro lado, los experimentos de expresión proteica e inmunofluorescencia indican el incremento de LC3II, acompañado por un incremento de p62/SQSTM1, indicando así el bloqueo del flujo autofágico en el riñón ante la administración de BPA, tanto a 2 y 5 semanas, independientemente de presentar o no una disfunción renal previa. Cabe destacar que los grupos con nefrectomía 5/6 y expuestos a BPA, tanto a 2 y 5 semanas, presentan valores más elevados de dichas proteínas, hecho que podría deberse a que el daño en dichos grupos es mayor y se induce una mayor respuesta a esta vía. Por lo tanto, la administración de BPA en los experimentos *in vitro* e *in vivo* sugieren, como se ha descrito en la bibliografía previa, que el BPA es capaz de producir una alteración en el flujo de autofagia, lo cual podría estar relacionado con el incremento en la inflamación y fibrosis renal observado en nuestros modelos. Esta disfunción autofágica podría estar afectando y alterando la inhibición de vías clave en estos procesos, tales como NF- $\kappa$ B en la inflamación y TGF- $\beta$  en la fibrosis.

Como se ha expuesto previamente en esta tesis, el proceso inflamatorio está involucrado en la progresión de la ERC.<sup>19, 20</sup> En este sentido, Lee y col. sugieren que la exposición a BPA en células humanas de mastocitos HMC-1 incrementa los niveles de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6, mediante la activación de señales relacionadas con la respuesta inflamatoria, como NF- $\kappa$ B, p38 MAPK, ERK, AP-1.<sup>229, 230</sup> Por otro lado, la administración de BPA provocó la activación de ER $\beta$ , ERK, JNK y NF- $\kappa$ B, y el incremento de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 en células microgliales BV2.<sup>231</sup> El aumento de estas citoquinas, junto con la disminución de citoquinas antiinflamatorias como IL-10, también fue observado en cultivo primario de macrófagos humanos.<sup>232</sup> Adicionalmente, en estudios experimentales, la exposición a BPA produjo el incremento de la inflamación del miocardio y pericardio, así como el aumento en el número de células T y citoquinas proinflamatorias, como IL-1 $\beta$  o IL-17A.<sup>233</sup>

Los resultados obtenidos en esta tesis en células túbulo epiteliales humanas, confirman que la exposición a BPA incrementa la expresión de genes clave para los procesos inflamatorios, como IL-6 y CCL2, fundamentales para la regulación del reclutamiento de células inflamatorias en el riñón.<sup>234</sup> Una de las vías por las cuales el BPA podría estar incrementando la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-6, sería la vía NF- $\kappa$ B, ya que la estimulación con BPA produce su fosforilación y traslocación al núcleo.<sup>215</sup> Además, en ese mismo estudio se observó que el BPA promueve la fosforilación de STAT, otro factor de transcripción proinflamatorio, a



través de la fosforilación de JAK1 y JAK2.<sup>215</sup> Por lo tanto, el BPA podría estar incrementado la expresión de citoquinas proinflamatorias a través de dichos factores de transcripción.

Por otro lado, en el modelo *in vivo* llevado a cabo en esta tesis, pudimos observar cómo la exposición de BPA produjo un incremento en la presencia de linfocitos T CD3<sup>+</sup> en el espacio intersticial renal en ratones con función renal normal de manera tiempo dependiente. Además, los ratones con nefrectomía subtotal expuestos a BPA presentaron niveles mayores de linfocitos T CD3<sup>+</sup> en comparación con el grupo control nefrectomizado. También hemos comprobado que la exposición a BPA incrementó la expresión génica de marcadores claves para el proceso inflamatorio y reclutamiento de células inflamatorias como IL-6, CCL2 y CCL5, tanto en los grupos con función renal normal como en los de función renal comprometida, siendo estos los que mayor expresión presentaron, produciéndose así un efecto sinérgico entre el BPA y el deterioro de la función renal previa. Estos resultados sugieren que la exposición a BPA tanto *in vitro* como *in vivo* producen un incremento en la expresión de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, como IL-6, CCL2 o CCL5, e inducción del reclutamiento de células inmunitarias como linfocitos T en el riñón, al igual que ocurre en otros modelos experimentales de otras patologías descritos en la literatura, pudiendo estar implicadas las vías NF- $\kappa$ B y STAT.

Por último, un daño persistente en el riñón podría generar que el proceso normal de reparación tisular no se lleve a cabo correctamente, produciéndose una cronificación del daño, conduciendo a la acumulación de proteínas de la matriz extracelular, como colágeno I, III y IV o fibronectina.<sup>28</sup> Existen diversos estudios que relacionan la fibrosis con la acción del BPA en diferentes órganos. En un modelo experimental, Li y col. observaron que la exposición a BPA indujo fibrosis cardíaca e incremento de fibrosis intersticial, a través de una marcada proliferación de fibroblastos cardíacos e incremento en la producción de colágeno mediante la activación de receptores estrogénicos y la vía de señalización ERK1/2.<sup>235</sup> Además, en otro modelo experimental descrito por El-Sayed Elswefy y col., la administración de BPA produjo fibrosis hepática, representada por una deposición masiva de colágeno e incremento en el contenido de hidroxiprolina (marcador de fibrosis) en tejido.<sup>236</sup>

Los experimentos *in vitro* realizados en esta tesis, concretamente en las células túbulo epiteliales humanas, muestran que la exposición a BPA es capaz de incrementar la expresión de genes fibróticos, como *FNDC5* y *SERPEN*, de manera dosis dependiente. Además, dicha exposición también produjo el incremento de proteínas de la matriz extracelular, como fibronectina. De manera notable, los estudios *in vivo* llevados a cabo corroboran los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro*, puesto que la administración de BPA a 2 y 5 semanas produjo un incremento en los depósitos de colágeno en las muestras de riñón de los grupos sin y con función renal comprometida. Además, observamos que la administración de BPA



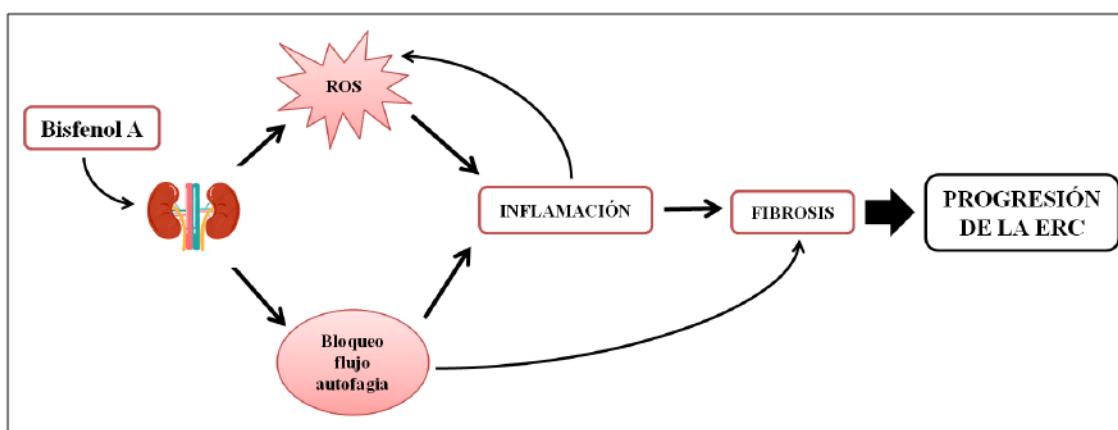
incrementa los niveles de proteínas de matriz extracelular, como fibronectina. No obstante, la administración de BPA a 2 y 5 semanas y la pérdida de función renal no producen un efecto sinérgico en cuanto a la inducción del proceso fibrótico, ya que los resultados obtenidos son similares a los del grupo nefrectomizado sin administración de BPA, hecho que si ocurría en cuanto a la inducción del proceso inflamatorio. Sin embargo, cabe destacar que los grupos con función renal normal y administrados con BPA a 2 y 5 semanas sí presentaron incrementos en los depósitos de colágeno y los niveles proteicos de fibronectina, por lo tanto, sí sufrieron un proceso fibrótico dependiente de BPA. Por último, nuestros resultados corroboran los resultados obtenidos por otros grupos de investigación en otras patologías, en los cuales se ha descrito que la presencia de BPA produce una activación del proceso fibrótico en el riñón.

En resumen, los experimentos realizados en esta tesis muestran que la exposición a BPA en el riñón con o sin función renal comprometida, provoca un incremento en la vía antioxidante celular Nrf2, que junto con los resultados previos del laboratorio en cultivos celulares, sugieren un incremento de ROS y disfunción mitocondrial. Además, la presencia de BPA indujo el bloqueo del flujo autofágico al incrementarse dos de sus proteínas clave (LC3II y p62/SQSTM1) en los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Por último, observamos que la estimulación con BPA generó un incremento en la respuesta inflamatoria e inducción de fibrosis renal. En general, una disfunción renal previa junto con la administración de BPA a 2 y 5 semanas produce un incremento sinérgico de las rutas anteriormente mencionadas, produciéndose esto en menor medida cuando la función renal no está alterada.

Finalmente, la pérdida de función renal es uno de los problemas más importantes en la ERC. Nuestros resultados han demostrado que la administración de BPA acelera la pérdida de función renal e incrementa los efectos negativos de la patología, como son el incremento en la respuesta inflamatoria y fibrótica. Un problema grave en las patologías renales es la ausencia de un biomarcador de progresión del daño renal fiable. En la actualidad, existen diversos potenciales biomarcadores de daño renal, destacando las proteínas N-Gal y Kim1. En esta tesis, la evaluación de los niveles de estos marcadores en los grupos sin la función renal previamente comprometida mostró que la administración de BPA produjo un incremento en su expresión renal independientemente del tiempo de administración. No obstante, los datos de BUN nos indican que se necesita un mayor tiempo de exposición a BPA para poder confirmar el daño renal, ya que el grupo expuesto a 5 semanas sí presentó incrementos respecto al grupo control. Por otro lado, los resultados presentados en esta memoria también muestran que la administración de BPA en los grupos con función renal previamente comprometida incrementa de manera exacerbada los valores de expresión renal de estos marcadores (N-Gal y Kim1) en comparación con el grupo nefrectomizado sin exposición a BPA, independientemente del tiempo de exposición. Sin

embargo, los datos obtenidos de BUN no muestran grandes diferencias en comparación con el grupo nefrectomizado sin exposición a BPA, indicando que sería necesario un mayor tiempo de exposición para observar un mayor incremento de este indicador de daño.

En conclusión, los datos obtenidos en esta tesis muestran que la administración de BPA produce daño renal en ratones con función renal normal a tiempos cortos y crónicos, y exacerba el daño renal una vez existe disfunción renal previa, debido al incremento de estrés oxidativo y el bloqueo del flujo de autofagia, promoviendo así procesos inflamatorios y fibróticos que conducen a la progresión de la enfermedad renal (Figura 45). Es por ello que nuestro grupo de investigación considera al BPA como una toxina exógena, especialmente dañina para los pacientes con ERC, ya que es capaz de producir daños equivalentes a las toxinas urémicas y promover la progresión de la enfermedad renal.



**Figura 45.** Acción del bisfenol A sobre la progresión de la enfermedad renal crónica.

## 2. Evaluación del bisfenol S como alternativa al bisfenol A en el paciente renal en diálisis

Como se ha comentado en la *Introducción*, el BPS es una molécula ampliamente utilizada en la actualidad por la industria para reemplazar el BPA, pero debido a las similitudes entre ambas moléculas, se plantean las preguntas de si el BPS puede considerarse un reemplazo seguro. En particular, la seguridad del BPS es especialmente relevante para los pacientes con ERC en diálisis, al ser una molécula que se elimina principalmente por la orina. Es por ello por lo que nos planteamos el estudio del efecto del BPS en pacientes con ERC en HD, así como su comparación con el BPA y la evaluación de su potencial tóxico.

Una de las cuestiones más relevantes para el paciente renal es la toxicidad aguda y crónica del BPS. Como se recoge en la literatura y en los resultados expuestos anteriormente en esta memoria, la toxicidad del BPA proviene a través de diferentes mecanismos, como el estrés

oxidativo, la disfunción del flujo autofágico o el incremento del proceso inflamatorio. En este sentido, cabría pensar que el BPS también podría ser tóxico promoviendo mecanismos similares, teniendo en cuenta las similitudes estructurales de ambas moléculas como se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, existe escasa literatura sobre la toxicidad del BPS, y los estudios realizados utilizan concentraciones muy elevadas en comparación con los observados en los resultados.<sup>237-241</sup> Además, diversos estudios demuestran que la barrera hemato-placentaria es más eficaz para limitar la exposición fetal al BPS que al BPA.<sup>242</sup> Por otra parte, también se han realizado estudios transversales de los bisfenoles urinarios, entre los que se incluye el BPA y el BPS, con la diabetes mellitus, y solo se observó una asociación positiva no lineal entre concentraciones más bajas de BPA y diabetes mellitus,<sup>243</sup> destacando así la toxicidad *per se* del BPA frente al resto de bisfenoles.

En primer lugar, los resultados *in vitro* muestran que la toxicidad *per se* del BPS es inferior a la que presenta el BPA en células túbulo epiteliales humanas. Además, pudimos observar cómo la exposición a BPS en las células no modificó su morfología, hecho que sí ocurrió ante la exposición a BPA. Por otro lado, al exponer las células a BPS no se produjeron incrementos en la expresión génica de citoquinas proinflamatorias como IL-6 o TNF- $\alpha$ , o incrementos en la vía antioxidante Nrf2, es decir, no se indujeron procesos inflamatorios, ni de estrés oxidativo. Sin embargo, la exposición a BPA sí que generó dichos incrementos, produciéndose la activación de ambas vías y corroborando así también los resultados obtenidos con anterioridad en esta tesis.

En relación con la exposición de BPS en la población general cabe señalar que esta es todavía moderada. La ingesta diaria de BPS estimada en China fue menor de 0,25 ng/kg/día, una concentración mucho inferior a las dosis de referencia oral para BPA (4 $\mu$ g/kg/día) recomendadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.<sup>188</sup> Además, en los estudios de orina se detectó BPA en el 85% de las muestras puntuales analizadas, mientras que el BPS sólo se pudo detectar en el 13% de las muestras.<sup>244</sup> Los resultados obtenidos en esta tesis están en consonancia con dichas observaciones, ya que el BPS en plasma era indetectable o estaba justo por encima del límite de detección en sujetos sanos, lo cual refleja una exposición ambiental más baja que el BPA. Sin embargo, a pesar de la menor exposición ambiental de la población general a este compuesto, los resultados obtenidos muestran por primera vez que la concentración plasmática de BPS está aumentada en pacientes con ERC en HD, sugiriendo una acumulación en estos pacientes. Los mecanismos por los cuales se produce esta acumulación son probablemente los mismos que para el BPA, siendo la principal causa, la falta de eliminación renal junto con la posible transferencia desde las membranas de diálisis.<sup>182</sup> Aún así, los niveles plasmáticos de BPS fueron mucho menores que los valores plasmáticos de BPA en los pacientes en HD, lo cual, junto con la citotoxicidad observada en cultivos celulares, mucho menor en BPS, son tranquilizadores.



No obstante, aún quedan muchas cuestiones por ser esclarecidas en relación con el BPS en la HD, como saber si se puede acumular en diferentes tipos celulares u órganos, conocer su farmacocinética en pacientes con ERC o indagar si la exposición a largo plazo podría ser tóxica y si esta presunta toxicidad podría ser específica de tipo celular.

Asimismo, los datos obtenidos en este trabajo son consistentes en cuanto a la fuente potencial de BPS por parte de los dializadores para los pacientes en diálisis, ya que fueron hallados restos de BPS en las fibras de los dializadores estudiados (PN y PS). No obstante, los valores de fuga de BPS en ambas fibras fueron considerablemente menores a los obtenidos de BPA. Por otro lado, en las fibras de los dializadores de PN no se hallaron restos de BPA como era de esperar. Cabe destacar que los porcentajes de monómeros libres obtenidos fueron los esperados en un dispositivo para uso médico. Por consiguiente, ambas fibras son bastante estables en las condiciones encontradas en diálisis, siendo mínimas las cantidades medidas, pero detectables.

Los resultados obtenidos en esta tesis en el estudio agudo, no mostraron grandes variaciones en las concentraciones plasmáticas de BPA o BPS después de las sesiones de diálisis con independencia del tipo de dializador (PN o PS). Sin embargo, se observó una tendencia en la acumulación de BPS después de las sesiones de diálisis independientemente del dializador. Cabe destacar que las concentraciones plasmáticas obtenidas de BPA en estos pacientes fueron 20 veces superiores a las de BPS, independientemente del dializador. Este dato podría indicar una mayor contaminación ambiental de BPA respecto a BPS a causa de su uso más frecuente en la industria.

Por otro lado, en estudios previos de nuestro laboratorio, en los cuales hubo un mayor número de pacientes tanto en HD <sup>182</sup> y HDF-OL, <sup>201</sup> observamos cómo el uso crónico de dializadores que contienen BPA (PS) se asoció a incrementos en los niveles plasmáticos de BPA. Los resultados obtenidos en esta tesis en el estudio crónico muestran, de manera similar a los hallazgos descritos anteriormente, que el uso crónico de los dializadores PS incrementó los niveles plasmáticos de BPA (aunque no se observaron incrementos significativos, sí se observó una tendencia al aumento en comparación con el uso de dializadores PN). En este sentido, el tamaño muestral puede haber impedido observar las diferencias estadísticamente significativas descritas con anterioridad en estudios más amplios de nuestro laboratorio. Con respecto al BPS, cabe destacar que ambos dializadores (PN y PS) contenían esta molécula. El dializador PN incrementó ligeramente las concentraciones de BPS en comparación con los dializadores PS, pero no fueron diferencias significativas. Sin embargo, las concentraciones obtenidas en ambos dializadores son significativamente mayores a las obtenidas en los pacientes sanos. No obstante, aunque no se obtuvieron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de BPA entre los dializadores, de manera muy relevante sí se observó un incremento en la concentración de BPA con el dializador PS entre el estudio agudo y el estudio crónico, hecho que no ocurrió con

el dializador PN. De manera similar, las concentraciones plasmáticas de BPS se incrementaron en ambos dializadores al comparar el estudio agudo y el crónico. Estos hechos indicarían que el incremento en las concentraciones de ambas moléculas proviene de la liberación del equipo de HD al producirse un aumento en la concentración de BPS en ambos dializadores dependiente del tiempo, y solo producirse el incremento en la concentración de BPA en el dializador que contiene dicha molécula (PS). Sin embargo, cabría destacar que se requieren estudios que utilicen dializadores sin BPS para caracterizar mejor la contribución relativa de los dializadores frente a otras fuentes ambientales a la acumulación de BPS en pacientes con ERC en diálisis, ya que la acumulación de BPS se ha descrito en pacientes con ERC sin diálisis. Recientemente, en un estudio de China, se determinó que el BPA y BPS séricos aumentó con la disminución de la función renal y estos valores son más elevados en pacientes con HD que en pacientes con DP,<sup>245</sup> respaldando así los resultados obtenidos en esta tesis, los cuales sugieren que este incremento de BPS proviene como se ha mencionado anteriormente, de la liberación del equipo de HD.

Por lo tanto, los resultados expuestos en esta tesis en los cuales analizamos concentraciones clínicamente relevantes de BPA y concentraciones hasta 10 veces más elevadas que las clínicamente relevantes de BPS, muestran que el BPS presenta una menor toxicidad *per se* que el BPA en cultivo celular de células túbulo epiteliales humanas. Debemos recordar que las células túbulo epiteliales pueden ser una fuente de inflamación sistémica y desempeñan funciones importantes en pacientes en diálisis al sintetizar proteínas como el factor antienvjecimiento Klotho y calcitriol.<sup>246, 247</sup> Dado que la inflamación sistémica regula negativamente la expresión de Klotho de las células tubulares,<sup>246</sup> y el mantenimiento de la expresión de este en modelos animales de daño renal agudo es nefroprotector,<sup>248</sup> podríamos especular que la elección de las membranas puede tener efectos potenciales sobre la recuperación de la función renal al presentar los pacientes menores concentraciones de BPA y disminuir así su inflamación sistémica y estrés oxidativo. Cabe destacar que nuestro estudio presenta ciertas limitaciones. Por un lado, el tamaño de la muestra fue relativamente pequeño para poder observar diferencias significativas en los niveles plasmáticos de BPA y BPS entre los distintos dializadores estudiados, aunque suficientemente grande como para detectar diferencias significativas para el ácido hipúrico. No obstante, debido a la escasa información existente en el momento del diseño del estudio, el periodo de lavado de una semana se eligió empíricamente y podría no haber sido un tiempo óptimo. En cualquier caso, los pacientes fueron aleatorizados con la membrana de prueba inicial y posteriormente se realizó el cruzamiento. Además, tampoco estudiamos los niveles tisulares de BPA o BPS en los pacientes, y el estudio crónico fue relativamente corto (meses) con respecto a la supervivencia potencial de décadas en la HD crónica. Por tanto, no podemos excluir las consecuencias a largo plazo de la acumulación de BPS en los tejidos de los pacientes.



En conclusión, los resultados obtenidos muestran que a pesar de que las membranas sintéticas son una fuente potencial para incrementar los niveles plasmáticos de BPS en pacientes en HD, el perfil de toxicidad *per se* del BPS es más seguro que el del BPA, al menos para los parámetros medidos en los estudios expuestos. Por lo tanto, podemos destacar que el BPS supone una mejor alternativa al BPA en estos pacientes. Sin embargo, debe prevalecer el principio de precaución y tener en cuenta que el BPS no puede considerarse inofensivo para los pacientes con ERC en HD hasta que se hagan estudios prospectivos detallados que confirmen su seguridad a largo plazo.

### 3. Evaluación de la intervención con probióticos durante 9 meses en el paciente con ERC en estadios III-IV

Una relación simbiótica con la microbiota intestinal es imprescindible para la salud. La flora intestinal regula la inmunidad local y sistémica,<sup>249</sup> contribuye al aporte de micronutrientes (producción de ácidos grasos de cadena corta o vitamina K) y al balance de nitrógeno.<sup>250</sup> Las alteraciones en la microbiota intestinal se han relacionado con la progresión de numerosas enfermedades como enfermedades inflamatorias, diabetes, obesidad, cáncer, trastornos alérgicos y ERC, entre otras.<sup>251</sup> En la ERC, Simenhoff y col. fueron los primeros en los años setenta en demostrar la alteración de la flora intestinal de estos pacientes.<sup>252</sup> Como se ha mencionado previamente en la *Introducción*, hay multitud de estudios en los que se ha confirmado la alteración de la microbiota intestinal en la ERC, fomentando así el incremento de precursores de toxinas urémicas como el pCS o IS.

Por estos motivos, se han propuesto diversas estrategias terapéuticas para modificar la absorción de los nutrientes precursores de toxinas urémicas, como la utilización de AST-20, aunque en un gran ensayo clínico multinacional no logró retardar la ERC,<sup>127</sup> o la administración de antibióticos de amplio espectro en modelos animales, en los cuales el agotamiento de la microbiota intestinal disminuyó la inflamación y atenuó el daño renal causado previamente.<sup>253</sup> Sin embargo, la utilización de antibióticos para reducir los niveles de toxinas urémicas no puede promoverse ya que son mayores los riesgos que los beneficios esperados. Por otro lado, se han probado prebióticos, probióticos y simbióticos, con el objetivo de mejorar la composición o actividad de la microbiota intestinal para reducir la disbiosis de estos pacientes<sup>117</sup> dado que en diversas patologías se obtuvieron resultados beneficiosos, como la mejora en la composición corporal en la obesidad<sup>254</sup> o en el síndrome metabólico.<sup>255</sup> No obstante, hasta la fecha los ensayos de intervención no son de calidad suficiente, puesto que comprenden periodos de intervención breves (4-12 semanas) o no evalúan la composición de la microbiota o los niveles de toxinas urémicas.<sup>256, 257</sup>

Es por ello que nos planteamos el ensayo expuesto en esta Tesis, en el cual los pacientes con ERC en estadios III-IV recibieron durante 9 meses el probiótico Vivomixx, el cual contiene tres géneros bacterianos (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*) con propiedades antiinflamatorias y protectoras, con el fin de observar sus efectos en la microbiota intestinal y los niveles de toxinas urémicas. En primer lugar, el tratamiento con el probiótico durante 9 meses produjo la variación en la diversidad de la microbiota intestinal de estos pacientes. Esta variación resultó ser beneficiosa, ya que después de la ingesta del probiótico los pacientes mostraron incrementos en el filo *Firmicutes* y disminución del filo *Bacteroidota*, indicando una mejora en la disbiosis al incrementarse la relación *Firmicutes/Bacteroidetes*. Además, las bacterias que pertenecen al filo *Firmicutes* son importantes productoras de ácidos grasos de cadena corta y están asociadas con una barrera intestinal saludable y con la reducción de la fuga de endotoxinas.<sup>258</sup> Finalmente, en el nivel taxonómico especie es donde encontramos más diferencias significativas entre los grupos de estudio, ya que se observan incrementos en las especies *Lactobacillus pentosus* y *Bifidobacterium animalis*, hecho que era de esperar ya que dichas bacterias se encontraban en la composición del probiótico, y la disminución en otras como *Bifidobacterium dentium* y *Streptococcus mutans*. El incremento del género *Lactobacillus* y de alguna de sus especies inhiben el crecimiento de organismos patógenos gracias a la producción de ácido láctico y de otros metabolitos que promueve respuestas antiinflamatorias y producción de antioxidantes.<sup>259</sup> Además, un probiótico con *Bifidobacterium animalis* demostró ser eficaz en la disminución de los niveles de toxinas urémicas y redujo la gravedad de la enfermedad en un modelo animal de ratas.<sup>260</sup> Tanto las especies *Bifidobacterium spp*, *Lactobacillus spp*, como *Streptococcus spp*, incrementadas también durante la intervención con probióticos, se correlacionan con un incremento en la producción de ácidos grasos de cadena corta, beneficiosos por su acción antioxidante.<sup>261</sup>

En segundo lugar, la intervención con probióticos no disminuyó significativamente los niveles de las toxinas urémicas estudiadas, aunque tampoco se produjeron incrementos significativos en las toxinas TMAO, pCS y ácido hipúrico, manteniendo los niveles plasmáticos del inicio. No obstante, sí se produjo el incremento significativo de la toxinas urémicas indolacético e IS a los 12 meses, pudiendo promover efectos adversos en estos pacientes, como el incremento del estrés oxidativo o inflamación.<sup>123, 125</sup> Por otro lado, observamos que los niveles de ácido fenilacético disminuyeron en comparación con el mes 0 después de la intervención con probióticos. Los resultados analíticos obtenidos en este estudio no mostraron cambios en los parámetros analizados, destacando así la estabilización en la progresión de la enfermedad renal durante el periodo de ingesta del probiótico.

Por lo general, podemos concluir que la administración de probióticos durante 9 meses en los pacientes del estudio no modificó los niveles de toxinas urémicas, a excepción del incremento de IS y la disminución de ácido fenilacético. No obstante, sí se produjo la modificación de la microbiota intestinal favoreciendo un ambiente nefroprotector al incrementarse familias bacterianas como *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp* y la mejora de la disbiosis intestinal al incrementarse la relación *Firmicutes/Bacteroidota*. Además, los resultados analíticos de los pacientes no mostraron el avance en la progresión de la enfermedad. Es por ello que pensamos que un incremento en el tiempo en la administración de probióticos mantendría una microbiota intestinal saludable para el enfermo renal y observaríamos efectos beneficiosos en los niveles de toxinas urémicas.

Cabe destacar que nuestro estudio presenta ciertas limitaciones, ya que nos faltaría un brazo control sin intervención con probiótico para observar si la no modificación de la microbiota de estos pacientes promueve el incremento en los niveles de toxinas urémicas en el organismo, favoreciendo así la progresión de la enfermedad renal. Un punto destacable del estudio es el tiempo de uso del probiótico puesto que fue de 36 semanas en comparación con el uso de probióticos que se encuentra en literatura (4-12 semanas), obteniendo mejores resultados en cuanto a la modificación de la microbiota intestinal. Sin embargo, la mayor limitación fue la baja potencia estadística debido al número de participantes del estudio. En este sentido, los resultados obtenidos justifican un estudio de mayor envergadura para poder obtener datos más concluyentes en cuanto a los niveles de toxinas urémicas.

## CONCLUSIONES

---



1. La exposición a BPA promueve la progresión de la ERC en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, a través de varios mecanismos:

1.1 Bloqueo del flujo de autofagia mediante el incremento de proteínas claves en esta vía, como LC3II y p62-SQSTM1.

1.2 Incremento en los niveles de expresión de ARNm y proteínas involucrados en la respuesta antioxidante (Nrf2, NQO1, HO-1).

1.3 Aumento de la respuesta inflamatoria incrementado la expresión génica de diversos mediadores proinflamatorios (como se ha demostrado para IL-6, CCL2, CCL5) e induciendo el infiltrado de células inflamatorias en el espacio intersticial en el modelo animal.

1.4 Incremento de la fibrosis renal *in vitro* e *in vivo* a través de la expresión proteica de componentes de la matriz extracelular, como fibronectina.

2. La administración de BPA induce daño renal en el modelo experimental de nefrectomía subtotal y en ratones con función renal normal.

3. El BPS resulta menos lesivo en comparación con el BPA en relación a citotoxicidad e inducción de procesos inflamatorios y de estrés oxidativo.

4. Los pacientes con ERC en diálisis tienen niveles plasmáticos de BPS y BPA muy superiores a la población con función renal normal. Además, los niveles plasmáticos de BPS son mucho menores que los de BPA en pacientes con ERC.

5. Los dializadores con membrana de polisulfona suponen una fuente potencial de BPA y BPS en pacientes con ERC en diálisis, mientras que los dializadores con membrana de polinefrona lo son de BPS.

6. La exposición a corto y largo plazo de los dializadores con diferentes membranas (polinefrona o polisulfona) en pacientes con ERC no modificó significativamente los niveles plasmáticos de BPS y BPA. Los niveles plasmáticos de BPA sí se incrementaron entre el estudio a corto y largo plazo con el dializador con membrana de polisulfona, hecho que no ocurría con el otro dializador ni con el BPS, indicando una acumulación de BPA procedente del dializador con membrana de polisulfona.

7. El consumo de probióticos en pacientes con ERC en estadios III y IV se asoció con una microbiota más saludable y diversa, aunque los niveles de toxinas urémicas no sufrieron cambios significativos, pero tampoco se incrementaron durante este periodo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

1. Matsushita, K.; van der Velde, M.; Astor, B. C.; Woodward, M.; Levey, A. S.; de Jong, P. E.; Coresh, J.; Gansevoort, R. T., Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet (London, England)* **2010**, *375*, 2073-81.
2. *KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*. 2013; Vol. Volume 3, p 163.
3. R. Alcázar, M. I. E., L. Orte, J. M.<sup>a</sup> Lobos, E. González Parra, F. Álvarez Guisasola<sup>3</sup>, J. L. Górriz, J. F. Navarro and A. L. Martín de Francisco, Documento de consenso SEN-semFYC sobre la enfermedad renal crónica. *Nefrología : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia* **2008**, *28*, 273-282.
4. Gansevoort, R. T.; Matsushita, K.; van der Velde, M.; Astor, B. C.; Woodward, M.; Levey, A. S.; de Jong, P. E.; Coresh, J., Lower estimated GFR and higher albuminuria are associated with adverse kidney outcomes. A collaborative meta-analysis of general and high-risk population cohorts. *Kidney international* **2011**, *80*, 93-104.
5. Mills, K. T.; Xu, Y.; Zhang, W.; Bundy, J. D.; Chen, C. S.; Kelly, T. N.; Chen, J.; He, J., A systematic analysis of worldwide population-based data on the global burden of chronic kidney disease in 2010. *Kidney international* **2015**, *88*, 950-7.
6. Rajiv Saran, M., Bruce Robinson, MD, Kevin C. Abbott, MD, Jennifer Bragg-Gresham, PhD, Xiaoying Chen, MS, Debbie Gipson, MD, Haoyu Gu, PhD, Richard A. Hirth, PhD, David Hutton, PhD, Yan Jin, PhD, Alissa Kapke, MS, Vivian Kurtz, MPH, Yiting Li, MPH, Keith McCullough, MS, PhD, Zubin Modi, MD, Hal Morgenstern, PhD, Purna Mukhopadhyay, PhD, Jeffrey Pearson, MS, Ronald Pisoni, PhD, Kaitlyn Repeck, MS, Douglas E. Schaubel, PhD, Ruth Shamraj, MA, Diane Steffick, MA, PhD, Megan Turf, BA, Kenneth J. Woodside, MD, Jie Xiang, PhD, Maggie Yin, MA, Xiaosong Zhang, MS, and Vahakn Shahinian, MD, US Renal Data System 2019 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *American Journal of Kidney Diseases* **January 2020**, *75*, 1-2.
7. Hall, M. E.; do Carmo, J. M.; da Silva, A. A.; Juncos, L. A.; Wang, Z.; Hall, J. E., Obesity, hypertension, and chronic kidney disease. *International journal of nephrology and renovascular disease* **2014**, *7*, 75-88.
8. Otero, A.; de Francisco, A.; Gayoso, P.; García, F., Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrología : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia* **2010**, *30*, 78-86.
9. Shlipak, M. G.; Fried, L. F.; Cushman, M.; Manolio, T. A.; Peterson, D.; Stehman-Breen, C.; Bleyer, A.; Newman, A.; Siscovick, D.; Psaty, B., Cardiovascular mortality risk in chronic kidney disease: comparison of traditional and novel risk factors. *Jama* **2005**, *293*, 1737-45.
10. Levey, A. S.; Eckardt, K. U.; Tsukamoto, Y.; Levin, A.; Coresh, J.; Rossert, J.; De Zeeuw, D.; Hostetter, T. H.; Lameire, N.; Eknoyan, G., Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney international* **2005**, *67*, 2089-100.

11. Levey, A. S.; Atkins, R.; Coresh, J.; Cohen, E. P.; Collins, A. J.; Eckardt, K. U.; Nahas, M. E.; Jaber, B. L.; Jadoul, M.; Levin, A.; Powe, N. R.; Rossert, J.; Wheeler, D. C.; Lameire, N.; Eknoyan, G., Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney international* **2007**, *72*, 247-59.
12. Bolognani, D.; Mattace-Raso, F.; Sijbrands, E. J.; Zoccali, C., The aging kidney revisited: a systematic review. *Ageing research reviews* **2014**, *14*, 65-80.
13. Couser, W. G.; Remuzzi, G.; Mendis, S.; Tonelli, M., The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases. *Kidney international* **2011**, *80*, 1258-70.
14. Viau, A.; El Karoui, K.; Laouari, D.; Burtin, M.; Nguyen, C.; Mori, K.; Pillebout, E.; Berger, T.; Mak, T. W.; Knebelmann, B.; Friedlander, G.; Barasch, J.; Terzi, F., Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *The Journal of clinical investigation* **2010**, *120*, 4065-76.
15. Harrill, A. H.; Sanders, A. P., Urinary MicroRNAs in Environmental Health: Biomarkers of Emergent Kidney Injury and Disease. *Current environmental health reports* **2020**, *7*, 101-108.
16. Brenner, B. M.; Cooper, M. E.; de Zeeuw, D.; Keane, W. F.; Mitch, W. E.; Parving, H. H.; Remuzzi, G.; Snapinn, S. M.; Zhang, Z.; Shahinfar, S., Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *The New England journal of medicine* **2001**, *345*, 861-9.
17. Ruiz-Ortega, M.; Lorenzo, O.; Suzuki, Y.; Rupérez, M.; Egido, J., Proinflammatory actions of angiotensins. *Current opinion in nephrology and hypertension* **2001**, *10*, 321-9.
18. Tripepi, G.; Mallamaci, F.; Zoccali, C., Inflammation Markers, Adhesion Molecules, and All-Cause and Cardiovascular Mortality in Patients with ESRD: Searching for the Best Risk Marker by Multivariate Modeling. *Journal of the American Society of Nephrology* **2005**, *16*, S83-S88.
19. Springer, T. A., Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annual review of physiology* **1995**, *57*, 827-72.
20. Sato, Y.; Yanagita, M., Immune cells and inflammation in AKI to CKD progression. *American journal of physiology. Renal physiology* **2018**, *315*, F1501-f1512.
21. Ebnet, K.; Kaldjian, E. P.; Anderson, A. O.; Shaw, S., Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annual review of immunology* **1996**, *14*, 155-77.
22. Jacobs, P.; Glorieux, G.; Vanholder, R., Interleukin/cytokine profiles in haemodialysis and in continuous peritoneal dialysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **2004**, *19 Suppl 5*, V41-45.



23. Schindler, R., Causes and therapy of microinflammation in renal failure. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **2004**, 19 Suppl 5, V34-40.
24. Sanz, A. B.; Sanchez-Niño, M. D.; Ramos, A. M.; Moreno, J. A.; Santamaria, B.; Ruiz-Ortega, M.; Egido, J.; Ortiz, A., NF-kappaB in renal inflammation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2010**, 21, 1254-62.
25. Guijarro, C.; Egido, J., Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney international* **2001**, 59, 415-24.
26. Ferenbach, D.; Kluth, D. C.; Hughes, J., Inflammatory cells in renal injury and repair. *Seminars in nephrology* **2007**, 27, 250-9.
27. Ruiz-Ortega, M.; Rayego-Mateos, S.; Lamas, S.; Ortiz, A.; Rodrigues-Diez, R. R., Targeting the progression of chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology* **2020**, 16, 269-288.
28. Shi-Wen, X.; Leask, A.; Abraham, D., Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis. *Cytokine & growth factor reviews* **2008**, 19, 133-44.
29. Zeisberg, M.; Kalluri, R., Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *American journal of physiology. Cell physiology* **2013**, 304, C216-25.
30. Lee, S. B.; Kalluri, R., Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. *Kidney international. Supplement* **2010**, S22-6.
31. Roberts, A. B.; Tian, F.; Byfield, S. D.; Stuelten, C.; Ooshima, A.; Saika, S.; Flanders, K. C., Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine & growth factor reviews* **2006**, 17, 19-27.
32. Hodgkins, K. S.; Schnaper, H. W., Tubulointerstitial injury and the progression of chronic kidney disease. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* **2012**, 27, 901-9.
33. Leaf, I. A.; Duffield, J. S., What can target kidney fibrosis? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **2017**, 32, i89-i97.
34. Meng, X. M.; Nikolic-Paterson, D. J.; Lan, H. Y., Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nature reviews. Nephrology* **2014**, 10, 493-503.
35. Wehrmann, M.; Bohle, A.; Held, H.; Schumm, G.; Kendziorra, H.; Pressler, H., Long-term prognosis of focal sclerosing glomerulonephritis. An analysis of 250 cases with particular regard to tubulointerstitial changes. *Clinical nephrology* **1990**, 33, 115-22.
36. Utsugi, M.; Dobashi, K.; Ishizuka, T.; Masubuchi, K.; Shimizu, Y.; Nakazawa, T.; Mori, M., C-Jun-NH2-terminal kinase mediates expression of connective tissue growth factor induced

by transforming growth factor-beta1 in human lung fibroblasts. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **2003**, 28, 754-61.

37. Carvajal, G.; Rodríguez-Vita, J.; Rodríguez-Díez, R.; Sánchez-López, E.; Rupérez, M.; Cartier, C.; Esteban, V.; Ortiz, A.; Egido, J.; Mezzano, S. A.; Ruiz-Ortega, M., Angiotensin II activates the Smad pathway during epithelial mesenchymal transdifferentiation. *Kidney international* **2008**, 74, 585-595.

38. Liu, X., A possible role for intracellular GSH in spontaneous reaction of a cysteine (T338C) engineered into the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *BioMetals* **2008**, 21, 277-287.

39. Wrana, J. L.; Attisano, L.; Wieser, R.; Ventura, F.; Massagué, J., Mechanism of activation of the TGF- $\beta$  receptor. *Nature* **1994**, 370, 341-347.

40. Shi, Y.; Massagué, J., Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **2003**, 113, 685-700.

41. Meng, X. M.; Chung, A. C.; Lan, H. Y., Role of the TGF- $\beta$ /BMP-7/Smad pathways in renal diseases. *Clinical science (London, England : 1979)* **2013**, 124, 243-54.

42. Yamamoto, T.; Noble, N. A.; Cohen, A. H.; Nast, C. C.; Hishida, A.; Gold, L. I.; Border, W. A., Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney international* **1996**, 49, 461-9.

43. Böttinger, E. P.; Bitzer, M., TGF-beta signaling in renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2002**, 13, 2600-10.

44. Duni, A.; Liakopoulos, V.; Roumeliotis, S.; Peschos, D.; Dounousi, E., Oxidative Stress in the Pathogenesis and Evolution of Chronic Kidney Disease: Untangling Ariadne's Thread. *Int J Mol Sci* **2019**, 20, 3711.

45. Holmström, K. M.; Finkel, T., Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2014**, 15, 411-21.

46. Finkel, T., Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of cell biology* **2011**, 194, 7-15.

47. Cross, C. E.; Halliwell, B.; Borish, E. T.; Pryor, W. A.; Ames, B. N.; Saul, R. L.; McCord, J. M.; Harman, D., Oxygen radicals and human disease. *Annals of internal medicine* **1987**, 107, 526-45.

48. Dröge, W., Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* **2002**, 82, 47-95.

49. Fisher, A. B., Redox signaling across cell membranes. *Antioxid Redox Signal* **2009**, 11, 1349-1356.

50. Fukai, T.; Ushio-Fukai, M., Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* **2011**, 15, 1583-606.

51. Lambeth, J. D., Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free radical biology & medicine* **2007**, *43*, 332-47.
52. Schieber, M.; Chandel, N. S., ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology : CB* **2014**, *24*, R453-62.
53. Ma, Q., Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2013**, *53*, 401-426.
54. Che, R.; Yuan, Y.; Huang, S.; Zhang, A., Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases. *American journal of physiology. Renal physiology* **2014**, *306*, F367-78.
55. Galvan, D. L.; Green, N. H.; Danesh, F. R., The hallmarks of mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease. *Kidney international* **2017**, *92*, 1051-1057.
56. Landray, M. J.; Wheeler, D. C.; Lip, G. Y. H.; Newman, D. J.; Blann, A. D.; McGlynn, F. J.; Ball, S.; Townsend, J. N.; Baigent, C., Inflammation, endothelial dysfunction, and platelet activation in patients with chronic kidney disease: the chronic renal impairment in Birmingham (CRIB) study. *American Journal of Kidney Diseases* **2004**, *43*, 244-253.
57. Goicoechea, M.; de Vinuesa, S. G.; Lahera, V.; Cachofeiro, V.; Gómez-Campderá, F.; Vega, A.; Abad, S.; Luño, J., Effects of Atorvastatin on Inflammatory and Fibrinolytic Parameters in Patients with Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **2006**, *17*, S231.
58. Kim, H. J.; Vaziri, N. D., Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *American journal of physiology. Renal physiology* **2010**, *298*, F662-71.
59. Greiber, S.; Müller, B.; Daemisch, P.; Pavenstädt, H., Reactive Oxygen Species Alter Gene Expression in Podocytes: Induction of Granulocyte Macrophage-Colony-Stimulating Factor. *Journal of the American Society of Nephrology* **2002**, *13*, 86.
60. Oberg, B. P.; McMenamin, E.; Lucas, F. L.; McMonagle, E.; Morrow, J.; Ikizler, T. A.; Himmelfarb, J., Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney international* **2004**, *65*, 1009-16.
61. Tarng, D. C.; Wen Chen, T.; Huang, T. P.; Chen, C. L.; Liu, T. Y.; Wei, Y. H., Increased oxidative damage to peripheral blood leukocyte DNA in chronic peritoneal dialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2002**, *13*, 1321-30.
62. Ward, R. A.; McLeish, K. R., Hemodialysis with cellulose membranes primes the neutrophil oxidative burst. *Artificial organs* **1995**, *19*, 801-7.
63. Boya, P.; Reggiori, F.; Codogno, P., Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature cell biology* **2013**, *15*, 713-20.
64. Mizushima, N.; Komatsu, M., Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **2011**, *147*, 728-41.

65. Levine, B.; Kroemer, G., Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell* **2019**, *176*, 11-42.
66. Morishita, H.; Mizushima, N., Diverse Cellular Roles of Autophagy. *Annual review of cell and developmental biology* **2019**, *35*, 453-475.
67. Kroemer, G.; Mariño, G.; Levine, B., Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* **2010**, *40*, 280-93.
68. Chen, Y.; Klionsky, D. J., The regulation of autophagy - unanswered questions. *Journal of cell science* **2011**, *124*, 161-70.
69. Park, J. M.; Jung, C. H.; Seo, M.; Otto, N. M.; Grunwald, D.; Kim, K. H.; Moriarity, B.; Kim, Y. M.; Starker, C.; Nho, R. S.; Voytas, D.; Kim, D. H., The ULK1 complex mediates MTORC1 signaling to the autophagy initiation machinery via binding and phosphorylating ATG14. *Autophagy* **2016**, *12*, 547-64.
70. Park, J. M.; Seo, M.; Jung, C. H.; Grunwald, D.; Stone, M.; Otto, N. M.; Toso, E.; Ahn, Y.; Kyba, M.; Griffin, T. J.; Higgins, L.; Kim, D. H., ULK1 phosphorylates Ser30 of BECN1 in association with ATG14 to stimulate autophagy induction. *Autophagy* **2018**, *14*, 584-597.
71. Kihara, A.; Noda, T.; Ishihara, N.; Ohsumi, Y., Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* **2001**, *152*, 519-30.
72. Zhong, Y.; Wang, Q. J.; Li, X.; Yan, Y.; Backer, J. M.; Chait, B. T.; Heintz, N.; Yue, Z., Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature cell biology* **2009**, *11*, 468-76.
73. Walczak, M.; Martens, S., Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation. *Autophagy* **2013**, *9*, 424-5.
74. Lőrincz, P.; Juhász, G., Autophagosome-Lysosome Fusion. *Journal of molecular biology* **2020**, *432*, 2462-2482.
75. Lilienbaum, A., Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int J Biochem Mol Biol* **2013**, *4*, 1-26.
76. Ding, Y.; Kim, S. I.; Lee, S.-Y.; Koo, J. K.; Wang, Z.; Choi, M. E., Autophagy regulates TGF- $\beta$  expression and suppresses kidney fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2014**, *25*, 2835-2846.
77. Alani, H.; Tamimi, A.; Tamimi, N., Cardiovascular co-morbidity in chronic kidney disease: Current knowledge and future research needs. *World journal of nephrology* **2014**, *3*, 156-68.
78. Fishbane, S.; Block, G. A.; Loram, L.; Neylan, J.; Pergola, P. E.; Uhlig, K.; Chertow, G. M., Effects of Ferric Citrate in Patients with Nondialysis-Dependent CKD and Iron Deficiency Anemia. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2017**, *28*, 1851-1858.



79. Ghazan-Shahi, S.; Koh, T. J. K.; Chan, C. T., Impact of nocturnal hemodialysis on peripheral uremic neuropathy. *BMC Nephrology* **2015**, *16*, 134.
80. Degrassi, F.; Quaia, E.; Martingano, P.; Cavallaro, M.; Cova, M. A., Imaging of haemodialysis: renal and extrarenal findings. *Insights Imaging* **2015**, *6*, 309-321.
81. Wetmore, J. B.; Peng, Y.; Jackson, S.; Matlon, T. J.; Collins, A. J.; Gilbertson, D. T., Patient characteristics, disease burden, and medication use in stage 4 - 5 chronic kidney disease patients. *Clinical nephrology* **2016**, *85*, 101-11.
82. Amaresan, M. S.; Geetha, R., Early diagnosis of CKD and its prevention. *The Journal of the Association of Physicians of India* **2008**, *56*, 41-6.
83. Thomas, B.; Wulf, S.; Bikbov, B.; Perico, N.; Cortinovis, M.; Courville de Vaccaro, K.; Flaxman, A.; Peterson, H.; Delossantos, A.; Haring, D.; Mehrotra, R.; Himmelfarb, J.; Remuzzi, G.; Murray, C.; Naghavi, M., Maintenance Dialysis throughout the World in Years 1990 and 2010. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2015**, *26*, 2621-33.
84. Liyanage, T.; Ninomiya, T.; Jha, V.; Neal, B.; Patrice, H. M.; Okpechi, I.; Zhao, M. H.; Lv, J.; Garg, A. X.; Knight, J.; Rodgers, A.; Gallagher, M.; Kotwal, S.; Cass, A.; Perkovic, V., Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. *Lancet (London, England)* **2015**, *385*, 1975-82.
85. Locatelli, F.; Del Vecchio, L.; Pozzoni, P.; Manzoni, C., Nephrology: main advances in the last 40 years. *Journal of nephrology* **2006**, *19*, 6-11.
86. Lorenzo V, L. G. J., Principios Físicos en Hemodiálisis. *Nefrología al día* **2019**.
87. Himmelfarb, J.; Ikizler, T. A., Hemodialysis. *The New England journal of medicine* **2010**, *363*, 1833-45.
88. Ward, R. A., Do clinical outcomes in chronic hemodialysis depend on the choice of a dialyzer? *Seminars in dialysis* **2011**, *24*, 65-71.
89. Ronco, C.; Brendolan, A.; Crepaldi, C.; Rodighiero, M.; Scabardi, M., Blood and dialysate flow distributions in hollow-fiber hemodialyzers analyzed by computerized helical scanning technique. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2002**, *13 Suppl 1*, S53-61.
90. Saito, A., Definition of high-performance membranes - from the clinical point of view. *Contributions to nephrology* **2011**, *173*, 1-10.
91. Fernández Lucas, M., Teruel Briones J L., Técnicas de Hemodiálisis. *Nefrología al día* **03-2020**.
92. Ahmad S, M. M., Hoenich N Daugirdas JT, *Handbook of Dialysis. Fourth Edition*. 2007; p 844.
93. Vanholder, R.; De Smet, R.; Glorieux, G.; Argilés, A.; Baurmeister, U.; Brunet, P.; Clark, W.; Cohen, G.; De Deyn, P. P.; Deppisch, R.; Descamps-Latscha, B.; Henle, T.; Jörres, A.;



- Lemke, H. D.; Massy, Z. A.; Passlick-Deetjen, J.; Rodriguez, M.; Stegmayr, B.; Stenvinkel, P.; Tetta, C.; Wanner, C.; Zidek, W.; For the European Uremic Toxin Work, G., Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney international* **2003**, *63*, 1934-1943.
94. Vanholder, R.; Fouque, D.; Glorieux, G.; Heine, G. H.; Kanbay, M.; Mallamaci, F.; Massy, Z. A.; Ortiz, A.; Rossignol, P.; Wiecek, A.; Zoccali, C.; London, G. M., Clinical management of the uraemic syndrome in chronic kidney disease. *The lancet. Diabetes & endocrinology* **2016**, *4*, 360-73.
95. Fujii, H.; Goto, S.; Fukagawa, M., Role of Uremic Toxins for Kidney, Cardiovascular, and Bone Dysfunction. *Toxins (Basel)* **2018**, *10*, 202.
96. Eloit, S.; Torremans, A. N.; De Smet, R.; Marescau, B.; De Wachter, D.; De Deyn, P. P.; Lameire, N.; Verdonck, P.; Vanholder, R., Kinetic behavior of urea is different from that of other water-soluble compounds: The case of the guanidino compounds. *Kidney international* **2005**, *67*, 1566-1575.
97. Vanholder, R., Introduction to the Toxins Special Issue on "Novel Issues in Uremic Toxicity". *Toxins (Basel)* **2018**, *10*, 388.
98. Grooteman, M. P.; van den Dorpel, M. A.; Bots, M. L.; Penne, E. L.; van der Weerd, N. C.; Mazairac, A. H.; den Hoedt, C. H.; van der Tweel, I.; Lévesque, R.; Nubé, M. J.; ter Wee, P. M.; Blankestijn, P. J., Effect of online hemodiafiltration on all-cause mortality and cardiovascular outcomes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2012**, *23*, 1087-96.
99. Schepers, E.; Glorieux, G.; Vanholder, R., The gut: the forgotten organ in uremia? *Blood purification* **2010**, *29*, 130-6.
100. Glorieux, G.; Schepers, E.; Vanholder, R. C., Uremic toxins in chronic renal failure. *Prilozi* **2007**, *28*, 173-204.
101. Vanholder, R.; Van Laecke, S.; Glorieux, G., What is new in uremic toxicity? *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* **2008**, *23*, 1211-1221.
102. Duranton, F.; Cohen, G.; De Smet, R.; Rodriguez, M.; Jankowski, J.; Vanholder, R.; Argiles, A., Normal and Pathologic Concentrations of Uremic Toxins. *Journal of the American Society of Nephrology* **2012**, *23*, 1258.
103. Brunet, P.; Gondouin, B.; Duval-Sabatier, A.; Dou, L.; Cerini, C.; Dignat-George, F.; Jourde-Chiche, N.; Argiles, A.; Burtey, S., Does uremia cause vascular dysfunction? *Kidney & blood pressure research* **2011**, *34*, 284-90.
104. Dzúrik, R.; Spustová, V.; Lajdová, I., Inhibition of glucose utilization in isolated rat soleus muscle by pseudouridine: implications for renal failure. *Nephron* **1993**, *65*, 108-10.
105. Vanholder, R.; Van Landschoot, N.; De Smet, R.; Schoots, A.; Ringoir, S., Drug protein binding in chronic renal failure: evaluation of nine drugs. *Kidney international* **1988**, *33*, 996-1004.

106. Zimmerman, L.; Bergström, J.; Jörnvall, H., A method for separation of middle molecules by high performance liquid chromatography: application in studies of glucuronyl-o-hydroxyhippurate in normal and uremic subjects. *Clinical nephrology* **1986**, *25*, 94-100.
107. Haag-Weber, M.; Mai, B.; Hörl, W. H., Impaired cellular host defence in peritoneal dialysis by two granulocyte inhibitory proteins. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **1994**, *9*, 1769-1773.
108. Vallance, P.; Leone, A.; Calver, A.; Collier, J.; Moncada, S., Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet (London, England)* **1992**, *339*, 572-5.
109. Costello, J. F.; Sadovnic, M. J.; Cottington, E. M., Plasma oxalate levels rise in hemodialysis patients despite increased oxalate removal. *Journal of the American Society of Nephrology* **1991**, *1*, 1289.
110. Savage, D. C., Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual review of microbiology* **1977**, *31*, 107-33.
111. Anders, H. J.; Andersen, K.; Stecher, B., The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney international* **2013**, *83*, 1010-6.
112. Ramezani, A.; Raj, D. S., The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2014**, *25*, 657-70.
113. Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, K. S.; Manichanh, C.; Nielsen, T.; Pons, N.; Levenez, F.; Yamada, T.; Mende, D. R.; Li, J.; Xu, J.; Li, S.; Li, D.; Cao, J.; Wang, B.; Liang, H.; Zheng, H.; Xie, Y.; Tap, J.; Lepage, P.; Bertalan, M.; Batto, J. M.; Hansen, T.; Le Paslier, D.; Linneberg, A.; Nielsen, H. B.; Pelletier, E.; Renault, P.; Sicheritz-Ponten, T.; Turner, K.; Zhu, H.; Yu, C.; Li, S.; Jian, M.; Zhou, Y.; Li, Y.; Zhang, X.; Li, S.; Qin, N.; Yang, H.; Wang, J.; Brunak, S.; Doré, J.; Guarner, F.; Kristiansen, K.; Pedersen, O.; Parkhill, J.; Weissenbach, J.; Bork, P.; Ehrlich, S. D.; Wang, J., A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **2010**, *464*, 59-65.
114. Hobby, G. P.; Karaduta, O.; Dusio, G. F.; Singh, M.; Zybilov, B. L.; Arthur, J. M., Chronic kidney disease and the gut microbiome. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **2019**, *316*, F1211-F1217.
115. Ramezani, A.; Massy, Z. A.; Meijers, B.; Evenepoel, P.; Vanholder, R.; Raj, D. S., Role of the Gut Microbiome in Uremia: A Potential Therapeutic Target. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **2016**, *67*, 483-98.
116. Nallu, A.; Sharma, S.; Ramezani, A.; Muralidharan, J.; Raj, D., Gut microbiome in chronic kidney disease: challenges and opportunities. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* **2017**, *179*, 24-37.
117. Fernandez-Prado, R.; Esteras, R.; Perez-Gomez, M. V.; Gracia-Iguacel, C.; Gonzalez-Parra, E.; Sanz, A. B.; Ortiz, A.; Sanchez-Niño, M. D., Nutrients Turned into Toxins: Microbiota Modulation of Nutrient Properties in Chronic Kidney Disease. *Nutrients* **2017**, *9*.

118. Evenepoel, P.; Poesen, R.; Meijers, B., The gut-kidney axis. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* **2017**, *32*, 2005-2014.
119. Castillo-Rodriguez, E.; Fernandez-Prado, R.; Esteras, R.; Perez-Gomez, M. V.; Gracia-Iguacel, C.; Fernandez-Fernandez, B.; Kanbay, M.; Tejedor, A.; Lazaro, A.; Ruiz-Ortega, M.; Gonzalez-Parra, E.; Sanz, A. B.; Ortiz, A.; Sanchez-Niño, M. D., Impact of Altered Intestinal Microbiota on Chronic Kidney Disease Progression. *Toxins (Basel)* **2018**, *10*.
120. Gryp, T.; Vanholder, R.; Vaneechoutte, M.; Glorieux, G., p-Cresyl Sulfate. *Toxins (Basel)* **2017**, *9*.
121. Wu, I. W.; Hsu, K. H.; Lee, C. C.; Sun, C. Y.; Hsu, H. J.; Tsai, C. J.; Tzen, C. Y.; Wang, Y. C.; Lin, C. Y.; Wu, M. S., p-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **2011**, *26*, 938-47.
122. Poveda, J.; Sanchez-Niño, M. D.; Glorieux, G.; Sanz, A. B.; Egido, J.; Vanholder, R.; Ortiz, A., p-cresyl sulphate has pro-inflammatory and cytotoxic actions on human proximal tubular epithelial cells. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **2014**, *29*, 56-64.
123. Vanholder, R.; Schepers, E.; Pletinck, A.; Nagler, E. V.; Glorieux, G., The uremic toxicity of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: a systematic review. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2014**, *25*, 1897-907.
124. Watanabe, H.; Miyamoto, Y.; Honda, D.; Tanaka, H.; Wu, Q.; Endo, M.; Noguchi, T.; Kadowaki, D.; Ishima, Y.; Kotani, S.; Nakajima, M.; Kataoka, K.; Kim-Mitsuyama, S.; Tanaka, M.; Fukagawa, M.; Otagiri, M.; Maruyama, T., p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney international* **2013**, *83*, 582-92.
125. Sun, C. Y.; Hsu, H. H.; Wu, M. S., p-Cresol sulfate and indoxyl sulfate induce similar cellular inflammatory gene expressions in cultured proximal renal tubular cells. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **2013**, *28*, 70-8.
126. Yamaguchi, J.; Tanaka, T.; Inagi, R., Effect of AST-120 in Chronic Kidney Disease Treatment: Still a Controversy? *Nephron* **2017**, *135*, 201-206.
127. Schulman, G.; Berl, T.; Beck, G. J.; Remuzzi, G.; Ritz, E.; Arita, K.; Kato, A.; Shimizu, M., Randomized Placebo-Controlled EPPIC Trials of AST-120 in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2015**, *26*, 1732-46.
128. Tchounwou, P. B.; Yedjou, C. G.; Patlolla, A. K.; Sutton, D. J., Heavy metal toxicity and the environment. *Experientia supplementum (2012)* **2012**, *101*, 133-64.
129. Malaguarnera, G.; Cataudella, E.; Giordano, M.; Nunnari, G.; Chisari, G.; Malaguarnera, M., Toxic hepatitis in occupational exposure to solvents. *World journal of gastroenterology* **2012**, *18*, 2756-66.



130. Serrano, S. E.; Braun, J.; Trasande, L.; Dills, R.; Sathyanarayana, S., Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data. *Environmental health : a global access science source* **2014**, *13*, 43.
131. Trasande, L.; Sathyanarayana, S.; Jo Messito, M.; R, S. G.; Attina, T. M.; Mendelsohn, A. L., Phthalates and the diets of U.S. children and adolescents. *Environmental research* **2013**, *126*, 84-90.
132. Dodds, E. C.; Goldberg, L.; Lawson, W.; Robinson, R., OEstrogenic Activity of Certain Synthetic Compounds. *Nature* **1938**, *141*, 247-248.
133. Sathyanarayana, S., Phthalates and children's health. *Current problems in pediatric and adolescent health care* **2008**, *38*, 34-49.
134. Rubin, B. S., Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **2011**, *127*, 27-34.
135. Shankar, A.; Teppala, S., Urinary bisphenol A and hypertension in a multiethnic sample of US adults. *Journal of environmental and public health* **2012**, *2012*, 481641.
136. Gayrard, V.; Lacroix, M. Z.; Collet, S. H.; Viguié, C.; Bousquet-Melou, A.; Toutain, P. L.; Picard-Hagen, N., High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environmental health perspectives* **2013**, *121*, 951-6.
137. Teeguarden, J. G.; Twaddle, N. C.; Churchwell, M. I.; Yang, X.; Fisher, J. W.; Seryak, L. M.; Doerge, D. R., 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A following ingestion in soup: Individual pharmacokinetic data and emographics. In *Data Brief* 2015; Vol. 4, pp 83-86.
138. Fenichel, P.; Chevalier, N.; Brucker-Davis, F., Bisphenol A: an endocrine and metabolic disruptor. *Annales d'endocrinologie* **2013**, *74*, 211-20.
139. Dekant, W.; Völkel, W., Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicology and applied pharmacology* **2008**, *228*, 114-34.
140. Yang, X.; Fisher, J. W., Unraveling bisphenol A pharmacokinetics using physiologically based pharmacokinetic modeling. *Frontiers in pharmacology* **2015**, *5*, 292-292.
141. Sakamoto, H.; Yokota, H.; Kibe, R.; Sayama, Y.; Yuasa, A., Excretion of bisphenol A-glucuronide into the small intestine and deconjugation in the cecum of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2002**, *1573*, 171-176.
142. Stahlhut, R. W.; Welshons, W. V.; Swan, S. H., Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. *Environmental health perspectives* **2009**, *117*, 784-9.
143. Koch, H. M.; Kolossa-Gehring, M.; Schröter-Kermani, C.; Angerer, J.; Brüning, T., Bisphenol A in 24 h urine and plasma samples of the German Environmental Specimen Bank from 1995 to 2009: A retrospective exposure evaluation. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* **2012**, *22*, 610-616.



144. Kovacic, P., How safe is bisphenol A? Fundamentals of toxicity: metabolism, electron transfer and oxidative stress. *Medical hypotheses* **2010**, 75, 1-4.
145. Marino, M.; Pellegrini, M.; La Rosa, P.; Acconcia, F., Susceptibility of estrogen receptor rapid responses to xenoestrogens: Physiological outcomes. *Steroids* **2012**, 77, 910-7.
146. Acconcia, F.; Pallottini, V.; Marino, M., Molecular Mechanisms of Action of BPA. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society* **2015**, 13, 1559325815610582.
147. Alonso-Magdalena, P.; Ropero, A. B.; Soriano, S.; García-Arévalo, M.; Ripoll, C.; Fuentes, E.; Quesada, I.; Nadal, Á., Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Molecular and cellular endocrinology* **2012**, 355, 201-7.
148. Rochester, J. R., Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* **2013**, 42, 132-55.
149. Ishido, M.; Masuo, Y.; Kunimoto, M.; Oka, S.; Morita, M., Bisphenol A causes hyperactivity in the rat concomitantly with impairment of tyrosine hydroxylase immunoreactivity. *Journal of neuroscience research* **2004**, 76, 423-33.
150. Kabuto, H.; Amakawa, M.; Shishibori, T., Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life sciences* **2004**, 74, 2931-40.
151. Rezg, R.; El-Fazaa, S.; Gharbi, N.; Mornagui, B., Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environment International* **2014**, 64, 83-90.
152. Babu, S.; Uppu, S.; Claville, M. O.; Uppu, R. M., Prooxidant actions of bisphenol A (BPA) phenoxyl radicals: implications to BPA-related oxidative stress and toxicity. *Toxicology mechanisms and methods* **2013**, 23, 273-80.
153. Sakuma, S.; Nakanishi, M.; Morinaga, K.; Fujitake, M.; Wada, S.; Fujimoto, Y., Bisphenol A 3,4-quinone induces the conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase in vitro. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **2010**, 48, 2217-22.
154. Ooe, H.; Taira, T.; Iguchi-Ariga, S. M. M.; Ariga, H., Induction of Reactive Oxygen Species by Bisphenol A and Abrogation of Bisphenol A-Induced Cell Injury by DJ-1. *Toxicological Sciences* **2005**, 88, 114-126.
155. Bosch-Panadero, E.; Mas, S.; Civantos, E.; Abaigar, P.; Camarero, V.; Ruiz-Priego, A.; Ortiz, A.; Egido, J.; González-Parra, E., Bisphenol A is an exogenous toxin that promotes mitochondrial injury and death in tubular cells. *Environmental toxicology* **2018**, 33, 325-332.
156. Khan, S.; Beigh, S.; Chaudhari, B. P.; Sharma, S.; Aliul Hasan Abdi, S.; Ahmad, S.; Ahmad, F.; Parvez, S.; Raisuddin, S., Mitochondrial dysfunction induced by Bisphenol A is a factor of its hepatotoxicity in rats. *Environmental toxicology* **2016**, 31, 1922-1934.

157. Leem, Y. H.; Oh, S.; Kang, H. J.; Kim, J. H.; Yoon, J.; Chang, J. S., BPA-toxicity via superoxide anion overload and a deficit in  $\beta$ -catenin signaling in human bone mesenchymal stem cells. *Environmental toxicology* **2017**, *32*, 344-352.
158. Murata, M.; Kang, J. H., Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways. *Biotechnology advances* **2018**, *36*, 311-327.
159. González-Parra, E.; Herrero, J. A.; Elewa, U.; Bosch, R. J.; Arduán, A. O.; Egido, J., Bisphenol a in chronic kidney disease. *International journal of nephrology* **2013**, *2013*, 437857.
160. Zhou, Q.; Miao, M.; Ran, M.; Ding, L.; Bai, L.; Wu, T.; Yuan, W.; Gao, E.; Wang, J.; Li, G.; Li, D. K., Serum bisphenol-A concentration and sex hormone levels in men. *Fertility and sterility* **2013**, *100*, 478-82.
161. Li, D. K.; Zhou, Z.; Miao, M.; He, Y.; Wang, J.; Ferber, J.; Herrinton, L. J.; Gao, E.; Yuan, W., Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertility and sterility* **2011**, *95*, 625-30.e1-4.
162. Welshons, W. V.; Nagel, S. C.; vom Saal, F. S., Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* **2006**, *147*, S56-69.
163. Fénichel, P.; Déchaux, H.; Harthe, C.; Gal, J.; Ferrari, P.; Pacini, P.; Wagner-Mahler, K.; Pugeat, M.; Brucker-Davis, F., Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. *Human reproduction (Oxford, England)* **2012**, *27*, 983-90.
164. Braun, J. M.; Kalkbrenner, A. E.; Calafat, A. M.; Yoltan, K.; Ye, X.; Dietrich, K. N.; Lanphear, B. P., Impact of early-life bisphenol A exposure on behavior and executive function in children. *Pediatrics* **2011**, *128*, 873-882.
165. Chou, W. C.; Chen, J. L.; Lin, C. F.; Chen, Y. C.; Shih, F. C.; Chuang, C. Y., Biomonitoring of bisphenol A concentrations in maternal and umbilical cord blood in regard to birth outcomes and adipokine expression: a birth cohort study in Taiwan. *Environmental health : a global access science source* **2011**, *10*, 94.
166. Smith-Bindman, R., Environmental causes of breast cancer and radiation from medical imaging: findings from the Institute of Medicine report. *Arch Intern Med* **2012**, *172*, 1023-1027.
167. Jenkins, S.; Wang, J.; Eltoum, I.; Desmond, R.; Lamartiniere, C. A., Chronic oral exposure to bisphenol A results in a nonmonotonic dose response in mammary carcinogenesis and metastasis in MMTV-erbB2 mice. *Environmental health perspectives* **2011**, *119*, 1604-9.
168. Alonso-Magdalena, P.; Morimoto, S.; Ripoll, C.; Fuentes, E.; Nadal, A., The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environmental health perspectives* **2006**, *114*, 106-12.
169. Alonso-Magdalena, P.; Ropero, A. B.; Soriano, S.; Quesada, I.; Nadal, A., Bisphenol-A: a new diabetogenic factor? *Hormones (Athens, Greece)* **2010**, *9*, 118-26.

170. Alonso-Magdalena, P.; Quesada, I.; Nadal, A., Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews. Endocrinology* **2011**, *7*, 346-53.
171. Lang, I. A.; Galloway, T. S.; Scarlett, A.; Henley, W. E.; Depledge, M.; Wallace, R. B.; Melzer, D., Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *Jama* **2008**, *300*, 1303-10.
172. Stojanoska, M. M.; Milosevic, N.; Milic, N.; Abenavoli, L., The influence of phthalates and bisphenol A on the obesity development and glucose metabolism disorders. *Endocrine* **2017**, *55*, 666-681.
173. Carwile, J. L.; Michels, K. B., Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003-2006. *Environmental research* **2011**, *111*, 825-30.
174. Melzer, D.; Osborne, N. J.; Henley, W. E.; Cipelli, R.; Young, A.; Money, C.; McCormack, P.; Luben, R.; Khaw, K. T.; Wareham, N. J.; Galloway, T. S., Urinary bisphenol A concentration and risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women. *Circulation* **2012**, *125*, 1482-90.
175. You, L.; Zhu, X.; Shrubsole, M. J.; Fan, H.; Chen, J.; Dong, J.; Hao, C. M.; Dai, Q., Renal function, bisphenol A, and alkylphenols: results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 2003-2006). *Environmental health perspectives* **2011**, *119*, 527-33.
176. Olea-Herrero, N.; Arenas, M. I.; Muñoz-Moreno, C.; Moreno-Gómez-Toledano, R.; González-Santander, M.; Arribas, I.; Bosch, R. J., Bisphenol-A Induces Podocytopathy With Proteinuria in Mice. *Journal of Cellular Physiology* **2014**, *229*, 2057-2066.
177. Boeniger, M. F.; Lowry, L. K.; Rosenberg, J., Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review. *American Industrial Hygiene Association journal* **1993**, *54*, 615-27.
178. Murakami, K.; Ohashi, A.; Hori, H.; Hibiya, M.; Shoji, Y.; Kunisaki, M.; Akita, M.; Yagi, A.; Sugiyama, K.; Shimozato, S.; Ito, K.; Takahashi, H.; Takahashi, K.; Yamamoto, K.; Kasugai, M.; Kawamura, N.; Nakai, S.; Hasegawa, M.; Tomita, M.; Nabeshima, K.; Hiki, Y.; Sugiyama, S., Accumulation of bisphenol A in hemodialysis patients. *Blood purification* **2007**, *25*, 290-4.
179. Shintani, H., Determination of the endocrine disrupter bisphenol—A in the blood of uremia patients treated by dialysis. *Chromatographia* **2001**, *53*, 331-333.
180. Yamasaki, H.; Nagake, Y.; Makino, H., Determination of Bisphenol A in Effluents of Hemodialyzers. *Nephron* **2001**, *88*, 376-378.
181. Haishima, Y.; Hayashi, Y.; Yagami, T.; Nakamura, A., Elution of bisphenol-A from hemodialyzers consisting of polycarbonate and polysulfone resins. *Journal of biomedical materials research* **2001**, *58*, 209-15.
182. Bosch-Panadero, E.; Mas, S.; Sanchez-Ospina, D.; Camarero, V.; Pérez-Gómez, M. V.; Saez-Calero, I.; Abaigar, P.; Ortiz, A.; Egido, J.; González-Parra, E., The Choice of Hemodialysis

Membrane Affects Bisphenol A Levels in Blood. *Journal of the American Society of Nephrology* : *JASN* **2016**, 27, 1566-74.

183. Sugimura, K.; Naganuma, T.; Kakiya, Y.; Okada, C.; Sugimura, T.; Kishimoto, T., Endocrine-disrupting chemicals in CAPD dialysate and effluent. *Blood purification* **2001**, 19, 21-23.

184. Emanuela Testai, P. H., Eduardo Rodriguez-Farré, Suresh Chandra Rastogi, Wim De Jong, Juana Bustos, Laurence Castle, Ursula Gundert-Remy, Arne Hensten, Hilde Molvig Kopperud, Nicolás Olea, Aldert Piersma. , Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. The safety of the use of bisphenol A in medical devices *European Commission* **2015**.

185. Chen, D.; Kannan, K.; Tan, H.; Zheng, Z.; Feng, Y.-L.; Wu, Y.; Widelka, M., Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity—A Review. *Environmental Science & Technology* **2016**, 50, 5438-5453.

186. Canada, G. o., ENVIRONMENTAL MONITORING AND SURVEILLANCE IN SUPPORT OF THE CHEMICALS MANAGEMENT PLAN. Bisphenol A in the Canadian Environment. Government of Canada, 2020; p 34.

187. Commission, T. E., Regards the restriction of use of bisphenol A in plastic infant feeding bottles. January 2011; Vol. 2002/72/EC

188. Wu, L.-H.; Zhang, X.-M.; Wang, F.; Gao, C.-J.; Chen, D.; Palumbo, J. R.; Guo, Y.; Zeng, E. Y., Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: A short review. *Science of The Total Environment* **2018**, 615, 87-98.

189. Danzl, E.; Sei, K.; Soda, S.; Ike, M.; Fujita, M., Biodegradation of bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S in seawater. *Int J Environ Res Public Health* **2009**, 6, 1472-1484.

190. Liao, C.; Liu, F.; Guo, Y.; Moon, H. B.; Nakata, H.; Wu, Q.; Kannan, K., Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the United States and several Asian countries: implications for human exposure. *Environ Sci Technol* **2012**, 46, 9138-45.

191. Agency, E. C., Bisphenol S Registration Data. Agency, E. C., Ed.2020.

192. Agency, E. C., Bisphenol A Registration Data. Agency, E. C., Ed.2020.

193. Song, Y.; Xie, P.; Cai, Z., Metabolism of bisphenol S in mice after oral administration. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2018**, 32, 495-502.

194. Asimakopoulos, A. G.; Xue, J.; De Carvalho, B. P.; Iyer, A.; Abualnaja, K. O.; Yaghmoor, S. S.; Kumosani, T. A.; Kannan, K., Urinary biomarkers of exposure to 57 xenobiotics and its association with oxidative stress in a population in Jeddah, Saudi Arabia. *Environmental research* **2016**, 150, 573-581.

195. Ye, X.; Wong, L. Y.; Kramer, J.; Zhou, X.; Jia, T.; Calafat, A. M., Urinary Concentrations of Bisphenol A and Three Other Bisphenols in Convenience Samples of U.S. Adults during 2000-2014. *Environ Sci Technol* **2015**, 49, 11834-9.



196. Yamazaki, E.; Yamashita, N.; Taniyasu, S.; Lam, J.; Lam, P. K.; Moon, H. B.; Jeong, Y.; Kannan, P.; Achyuthan, H.; Munuswamy, N.; Kannan, K., Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India. *Ecotoxicology and environmental safety* **2015**, *122*, 565-72.
197. Maćczak, A.; Cyrkler, M.; Bukowska, B.; Michałowicz, J., Bisphenol A, bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce different oxidative stress and damage in human red blood cells (in vitro study). *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **2017**, *41*, 143-149.
198. Rochester, J. R.; Bolden, A. L., Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environmental health perspectives* **2015**, *123*, 643-50.
199. Kojima, H.; Takeuchi, S.; Sanoh, S.; Okuda, K.; Kitamura, S.; Uramaru, N.; Sugihara, K.; Yoshinari, K., Profiling of bisphenol A and eight its analogues on transcriptional activity via human nuclear receptors. *Toxicology* **2019**, *413*, 48-55.
200. Ullah, H.; Jahan, S.; Ain, Q. U.; Shaheen, G.; Ahsan, N., Effect of bisphenol S exposure on male reproductive system of rats: A histological and biochemical study. *Chemosphere* **2016**, *152*, 383-91.
201. Mas, S.; Bosch-Panadero, E.; Abaigar, P.; Camarero, V.; Mahillo, I.; Civantos, E.; Sanchez-Ospina, D.; Ruiz-Priego, A.; Egido, J.; Ortiz, A.; González-Parra, E., Influence of dialysis membrane composition on plasma bisphenol A levels during online hemodiafiltration. *PloS one* **2018**, *13*, e0193288.
202. Nezu, M.; Suzuki, N.; Yamamoto, M., Targeting the KEAP1-NRF2 System to Prevent Kidney Disease Progression. *American journal of nephrology* **2017**, *45*, 473-483.
203. Song, Y.; Tao, Q.; Yu, L.; Li, L.; Bai, T.; Song, X.; Hu, H.; Li, Y.; Tan, X., Activation of autophagy contributes to the renoprotective effect of postconditioning on acute kidney injury and renal fibrosis. *Biochemical and biophysical research communications* **2018**, *504*, 641-646.
204. He, L.; Livingston, M. J.; Dong, Z., Autophagy in acute kidney injury and repair. *Nephron. Clinical practice* **2014**, *127*, 56-60.
205. Leventhal, J. S.; Wyatt, C. M.; Ross, M. J., Recycling to discover something new: the role of autophagy in kidney disease. *Kidney international* **2017**, *91*, 4-6.
206. Rodriguez, R. M.; Suarez-Alvarez, B.; Salvanés, R.; Huidobro, C.; Toraño, E. G.; Garcia-Perez, J. L.; Lopez-Larrea, C.; Fernandez, A. F.; Bueno, C.; Menendez, P.; Fraga, M. F., Role of BRD4 in hematopoietic differentiation of embryonic stem cells. *Epigenetics* **2014**, *9*, 566-78.
207. González-Casado, A.; Navas, N.; del Olmo, M.; Vílchez, J. L., Determination of bisphenol A in water by micro liquid-liquid extraction followed by silylation and gas chromatography-mass spectrometry analysis. *Journal of chromatographic science* **1998**, *36*, 565-9.

208. Huang, Y. Q.; Wong, C. K.; Zheng, J. S.; Bouwman, H.; Barra, R.; Wahlström, B.; Neretin, L.; Wong, M. H., Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environ Int* **2012**, *42*, 91-9.
209. Yuan, J.; Kong, Y.; Ommati, M. M.; Tang, Z.; Li, H.; Li, L.; Zhao, C.; Shi, Z.; Wang, J., Bisphenol A-induced apoptosis, oxidative stress and DNA damage in cultured rhesus monkey embryo renal epithelial Marc-145 cells. *Chemosphere* **2019**, *234*, 682-689.
210. Rezaee-Tazangi, F.; Zeidooni, L.; Rafiee, Z.; Fakhredini, F.; Kalantari, H.; Alidadi, H.; Khorsandi, L., Taurine effects on Bisphenol A-induced oxidative stress in the mouse testicular mitochondria and sperm motility. *JBRA assisted reproduction* **2020**, *24*, 428-435.
211. Kaur, S.; Saluja, M.; Bansal, M. P., Bisphenol A induced oxidative stress and apoptosis in mice testes: Modulation by selenium. *Andrologia* **2018**, *50*.
212. Lei, B.; Sun, S.; Xu, J.; Feng, C.; Yu, Y.; Xu, G.; Wu, M.; Peng, W., Low-concentration BPAF- and BPF-induced cell biological effects are mediated by ROS in MCF-7 breast cancer cells. *Environmental science and pollution research international* **2018**, *25*, 3200-3208.
213. Olukole, S. G.; Ola-Davies, E. O.; Lanipekun, D. O.; Oke, B. O., Chronic exposure of adult male Wistar rats to bisphenol A causes testicular oxidative stress: Role of gallic acid. *Endocrine regulations* **2020**, *54*, 14-21.
214. Wang, K.; Zhao, Z.; Ji, W., Bisphenol A induces apoptosis, oxidative stress and inflammatory response in colon and liver of mice in a mitochondria-dependent manner. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **2019**, *117*, 109182.
215. Huang, F. M.; Chang, Y. C.; Lee, S. S.; Yang, M. L.; Kuan, Y. H., Expression of pro-inflammatory cytokines and mediators induced by Bisphenol A via ERK-NF $\kappa$ B and JAK1/2-STAT3 pathways in macrophages. *Environmental toxicology* **2019**, *34*, 486-494.
216. Mezzano, S.; Aros, C.; Droguett, A.; Burgos, M. E.; Ardiles, L.; Flores, C.; Schneider, H.; Ruiz-Ortega, M.; Egido, J., NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **2004**, *19*, 2505-12.
217. Tang, C.; Livingston, M. J.; Liu, Z.; Dong, Z., Autophagy in kidney homeostasis and disease. *Nature reviews. Nephrology* **2020**, *16*, 489-508.
218. Kim, S. I.; Na, H. J.; Ding, Y.; Wang, Z.; Lee, S. J.; Choi, M. E., Autophagy promotes intracellular degradation of type I collagen induced by transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1. *The Journal of biological chemistry* **2012**, *287*, 11677-88.
219. Ding, Y.; Kim, J. K.; Kim, S. I.; Na, H. J.; Jun, S. Y.; Lee, S. J.; Choi, M. E., TGF- $\beta$ 1 protects against mesangial cell apoptosis via induction of autophagy. *The Journal of biological chemistry* **2010**, *285*, 37909-19.
220. Kimura, T.; Takabatake, Y.; Takahashi, A.; Kaimori, J. Y.; Matsui, I.; Namba, T.; Kitamura, H.; Niimura, F.; Matsusaka, T.; Soga, T.; Rakugi, H.; Isaka, Y., Autophagy protects

the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2011**, 22, 902-13.

221. Yamamoto, T.; Takabatake, Y.; Kimura, T.; Takahashi, A.; Namba, T.; Matsuda, J.; Minami, S.; Kaimori, J. Y.; Matsui, I.; Kitamura, H.; Matsusaka, T.; Niimura, F.; Yanagita, M.; Isaka, Y.; Rakugi, H., Time-dependent dysregulation of autophagy: Implications in aging and mitochondrial homeostasis in the kidney proximal tubule. *Autophagy* **2016**, 12, 801-13.

222. Peng, X.; Wang, Y.; Li, H.; Fan, J.; Shen, J.; Yu, X.; Zhou, Y.; Mao, H., ATG5-mediated autophagy suppresses NF- $\kappa$ B signaling to limit epithelial inflammatory response to kidney injury. *Cell death & disease* **2019**, 10, 253.

223. Kim, W. Y.; Nam, S. A.; Song, H. C.; Ko, J. S.; Park, S. H.; Kim, H. L.; Choi, E. J.; Kim, Y. S.; Kim, J.; Kim, Y. K., The role of autophagy in unilateral ureteral obstruction rat model. *Nephrology (Carlton, Vic.)* **2012**, 17, 148-59.

224. Kudo, A.; Kii, I., Periostin function in communication with extracellular matrices. *Journal of cell communication and signaling* **2018**, 12, 301-308.

225. Bian, X.; Bai, Y.; Su, X.; Zhao, G.; Sun, G.; Li, D., Knockdown of periostin attenuates 5/6 nephrectomy-induced intrarenal renin-angiotensin system activation, fibrosis, and inflammation in rats. *J Cell Physiol* **2019**, 234, 22857-22873.

226. Kimura, S.; Fujita, N.; Noda, T.; Yoshimori, T., Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3. *Methods in enzymology* **2009**, 452, 1-12.

227. Wu, Z. Z.; Zhang, J. J.; Gao, C. C.; Zhao, M.; Liu, S. Y.; Gao, G. M.; Zheng, Z. H., Expression of autophagy related genes mTOR, Becline-1, LC3 and p62 in the peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus. *American journal of clinical and experimental immunology* **2017**, 6, 1-8.

228. Yang, S.; Zhang, A.; Li, T.; Gao, R.; Peng, C.; Liu, L.; Cheng, Q.; Mei, M.; Song, Y.; Xiang, X.; Wu, C.; Xiao, X.; Li, Q., Dysregulated Autophagy in Hepatocytes Promotes Bisphenol A-Induced Hepatic Lipid Accumulation in Male Mice. *Endocrinology* **2017**, 158, 2799-2812.

229. Lee, J.; Lim, K. T., Expression of TNF-alpha and IL-6 in HMC-1 cells treated with bisphenol A is attenuated by plant-originating glycoprotein (75 kDa) by blocking p38 MAPK. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **2010**, 382, 51-61.

230. Shim, J. U.; Lim, K. T., Inhibitory effect of glycoprotein isolated from Cudrania tricuspidata bureau on expression of inflammation-related cytokine in bisphenol A-treated HMC-1 cells. *Inflammation* **2009**, 32, 211-7.

231. Zhu, J.; Jiang, L.; Liu, Y.; Qian, W.; Liu, J.; Zhou, J.; Gao, R.; Xiao, H.; Wang, J., MAPK and NF- $\kappa$ B pathways are involved in bisphenol A-induced TNF- $\alpha$  and IL-6 production in BV2 microglial cells. *Inflammation* **2015**, 38, 637-48.

232. Liu, Y.; Mei, C.; Liu, H.; Wang, H.; Zeng, G.; Lin, J.; Xu, M., Modulation of cytokine expression in human macrophages by endocrine-disrupting chemical Bisphenol-A. *Biochemical and biophysical research communications* **2014**, 451, 592-8.

233. Bruno, K. A.; Mathews, J. E.; Yang, A. L.; Frisancho, J. A.; Scott, A. J.; Greyner, H. D.; Molina, F. A.; Greenaway, M. S.; Cooper, G. M.; Bucek, A.; Morales-Lara, A. C.; Hill, A. R.; Mease, A. A.; Di Florio, D. N.; Sousou, J. M.; Coronado, A. C.; Stafford, A. R.; Fairweather, D., BPA Alters Estrogen Receptor Expression in the Heart After Viral Infection Activating Cardiac Mast Cells and T Cells Leading to Perimyocarditis and Fibrosis. *Frontiers in endocrinology* **2019**, *10*, 598.
234. Chung, A. C.; Lan, H. Y., Chemokines in renal injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2011**, *22*, 802-9.
235. Hu, Y.; Zhang, L.; Wu, X.; Hou, L.; Li, Z.; Ju, J.; Li, Q.; Qin, W.; Li, J.; Zhang, Q.; Zhou, T.; Zhang, L.; Xu, C.; Fang, Z.; Zhang, Y., Bisphenol A, an environmental estrogen-like toxic chemical, induces cardiac fibrosis by activating the ERK1/2 pathway. *Toxicology letters* **2016**, *250-251*, 1-9.
236. Elswefy, S. E.; Abdallah, F. R.; Atteia, H. H.; Wahba, A. S.; Hasan, R. A., Inflammation, oxidative stress and apoptosis cascade implications in bisphenol A-induced liver fibrosis in male rats. *International journal of experimental pathology* **2016**, *97*, 369-379.
237. Berni, M.; Gigante, P.; Bussolati, S.; Grasselli, F.; Grolli, S.; Ramoni, R.; Basini, G., Bisphenol S, a Bisphenol A alternative, impairs swine ovarian and adipose cell functions. *Domestic animal endocrinology* **2019**, *66*, 48-56.
238. Wang, W.; Zhang, X.; Qin, J.; Wei, P.; Jia, Y.; Wang, J.; Ru, S., Long-term bisphenol S exposure induces fat accumulation in liver of adult male zebrafish (*Danio rerio*) and slows yolk lipid consumption in F1 offspring. *Chemosphere* **2019**, *221*, 500-510.
239. Speidel, J. T.; Xu, M.; Abdel-Rahman, S. Z., Bisphenol A (BPA) and bisphenol S (BPS) alter the promoter activity of the ABCB1 gene encoding P-glycoprotein in the human placenta in a haplotype-dependent manner. *Toxicology and applied pharmacology* **2018**, *359*, 47-54.
240. Berto-Júnior, C.; Santos-Silva, A. P.; Ferreira, A. C. F.; Graceli, J. B.; de Carvalho, D. P.; Soares, P.; Romeiro, N. C.; Miranda-Alves, L., Unraveling molecular targets of bisphenol A and S in the thyroid gland. *Environmental science and pollution research international* **2018**, *25*, 26916-26926.
241. Lin, Z.; Zhang, X.; Zhao, F.; Ru, S., Bisphenol S promotes the cell cycle progression and cell proliferation through ER $\alpha$ -cyclin D-CDK4/6-pRb pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicology and applied pharmacology* **2019**, *366*, 75-82.
242. Grandin, F. C.; Lacroix, M. Z.; Gayrard, V.; Viguié, C.; Mila, H.; de Place, A.; Vayssière, C.; Morin, M.; Corbett, J.; Gayrard, C.; Gely, C. A.; Toutain, P. L.; Picard-Hagen, N., Is bisphenol S a safer alternative to bisphenol A in terms of potential fetal exposure ? Placental transfer across the perfused human placenta. *Chemosphere* **2019**, *221*, 471-478.
243. Duan, Y.; Yao, Y.; Wang, B.; Han, L.; Wang, L.; Sun, H.; Chen, L., Association of urinary concentrations of bisphenols with type 2 diabetes mellitus: A case-control study. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **2018**, *243*, 1719-1726.



244. Wang, Y. X.; Liu, C.; Shen, Y.; Wang, Q.; Pan, A.; Yang, P.; Chen, Y. J.; Deng, Y. L.; Lu, Q.; Cheng, L. M.; Miao, X. P.; Xu, S. Q.; Lu, W. Q.; Zeng, Q., Urinary levels of bisphenol A, F and S and markers of oxidative stress among healthy adult men: Variability and association analysis. *Environ Int* **2019**, *123*, 301-309.
245. Shen, Y.; Liu, T.; Shi, Y.; Zhuang, F.; Lu, J.; Zhu, Q.; Ding, F., Bisphenol A analogs in patients with chronic kidney disease and dialysis therapy. *Ecotoxicology and environmental safety* **2019**, *185*, 109684.
246. Moreno, J. A.; Izquierdo, M. C.; Sanchez-Niño, M. D.; Suárez-Alvarez, B.; Lopez-Larrea, C.; Jakubowski, A.; Blanco, J.; Ramirez, R.; Selgas, R.; Ruiz-Ortega, M.; Egido, J.; Ortiz, A.; Sanz, A. B., The inflammatory cytokines TWEAK and TNF $\alpha$  reduce renal klotho expression through NF $\kappa$ B. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2011**, *22*, 1315-25.
247. Fernandez-Fernandez, B.; Izquierdo, M. C.; Valiño-Rivas, L.; Nastou, D.; Sanz, A. B.; Ortiz, A.; Sanchez-Niño, M. D., Albumin downregulates Klotho in tubular cells. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **2018**, *33*, 1712-1722.
248. Liao, H. K.; Hatanaka, F.; Araoka, T.; Reddy, P.; Wu, M. Z.; Sui, Y.; Yamauchi, T.; Sakurai, M.; O'Keefe, D. D.; Núñez-Delgado, E.; Guillen, P.; Campistol, J. M.; Wu, C. J.; Lu, L. F.; Esteban, C. R.; Izpisua Belmonte, J. C., In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation. *Cell* **2017**, *171*, 1495-1507.e15.
249. Hooper, L. V.; Littman, D. R.; Macpherson, A. J., Interactions between the microbiota and the immune system. *Science (New York, N.Y.)* **2012**, *336*, 1268-73.
250. Hooper, L. V.; Midtvedt, T.; Gordon, J. I., How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual review of nutrition* **2002**, *22*, 283-307.
251. Lau, W. L.; Savoj, J.; Nakata, M. B.; Vaziri, N. D., Altered microbiome in chronic kidney disease: systemic effects of gut-derived uremic toxins. *Clinical science (London, England : 1979)* **2018**, *132*, 509-522.
252. Simenhoff, M. L.; Saukkonen, J. J.; Burke, J. F.; Wesson, L. G., Jr.; Schaedler, R. W.; Gordon, S. J., Bacterial populations of the small intestine in uremia. *Nephron* **1978**, *22*, 63-8.
253. Emal, D.; Rampanelli, E.; Stroo, I.; Butter, L. M.; Teske, G. J.; Claessen, N.; Stokman, G.; Florquin, S.; Leemans, J. C.; Dessing, M. C., Depletion of Gut Microbiota Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2017**, *28*, 1450-1461.
254. De Lorenzo, A.; Costacurta, M.; Merra, G.; Gualtieri, P.; Cioccoloni, G.; Marchetti, M.; Varvaras, D.; Docimo, R.; Di Renzo, L., Can psychobiotics intake modulate psychological profile and body composition of women affected by normal weight obese syndrome and obesity? A double blind randomized clinical trial. *Journal of translational medicine* **2017**, *15*, 135.
255. Bernini, L. J.; Simão, A. N.; Alfieri, D. F.; Lozovoy, M. A.; Mari, N. L.; de Souza, C. H.; Dichi, I.; Costa, G. N., Beneficial effects of Bifidobacterium lactis on lipid profile and cytokines

in patients with metabolic syndrome: A randomized trial. Effects of probiotics on metabolic syndrome. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* **2016**, 32, 716-9.

256. Koppe, L.; Mafra, D.; Fouque, D., Probiotics and chronic kidney disease. *Kidney international* **2015**, 88, 958-66.

257. McFarlane, C.; Ramos, C. I.; Johnson, D. W.; Campbell, K. L., Prebiotic, Probiotic, and Synbiotic Supplementation in Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation* **2019**, 29, 209-220.

258. Ortega-Hernández, A.; Martínez-Martínez, E.; Gómez-Gordo, R.; López-Andrés, N.; Fernández-Celis, A.; Gutiérrez-Miranda, B.; Nieto, M. L.; Alarcón, T.; Alba, C.; Gómez-Garre, D.; Cachofeiro, V., The Interaction between Mitochondrial Oxidative Stress and Gut Microbiota in the Cardiometabolic Consequences in Diet-Induced Obese Rats. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **2020**, 9.

259. Rossi, F.; Amadoro, C.; Colavita, G., Members of the Lactobacillus Genus Complex (LGC) as Opportunistic Pathogens: A Review. *Microorganisms* **2019**, 7.

260. Wang, X.; Yang, S.; Li, S.; Zhao, L.; Hao, Y.; Qin, J.; Zhang, L.; Zhang, C.; Bian, W.; Zuo, L.; Gao, X.; Zhu, B.; Lei, X. G.; Gu, Z.; Cui, W.; Xu, X.; Li, Z.; Zhu, B.; Li, Y.; Chen, S.; Guo, H.; Zhang, H.; Sun, J.; Zhang, M.; Hui, Y.; Zhang, X.; Liu, X.; Sun, B.; Wang, L.; Qiu, Q.; Zhang, Y.; Li, X.; Liu, W.; Xue, R.; Wu, H.; Shao, D.; Li, J.; Zhou, Y.; Li, S.; Yang, R.; Pedersen, O. B.; Yu, Z.; Ehrlich, S. D.; Ren, F., Aberrant gut microbiota alters host metabolome and impacts renal failure in humans and rodents. *Gut* **2020**, 69, 2131-2142.

261. Gryp, T.; Huys, G. R. B.; Joossens, M.; Van Biesen, W.; Glorieux, G.; Vaneechoutte, M., Isolation and Quantification of Uremic Toxin Precursor-Generating Gut Bacteria in Chronic Kidney Disease Patients. *Int J Mol Sci* **2020**, 21.


**ANEXOS**

---



## ORIGINAL ARTICLE

# Bisphenol S is a haemodialysis-associated xenobiotic that is less toxic than bisphenol A

Sebastian Mas <sup>1,2,\*</sup>, Alberto Ruiz-Priego<sup>1,\*</sup>, Pedro Abaigar<sup>3</sup>, Javier Santos<sup>3</sup>, Vanesa Camarero<sup>3</sup>, Jesús Egido<sup>1,2,4,5</sup>, Alberto Ortiz<sup>1,4,5,6</sup> and Emilio Gonzalez-Parra<sup>1,4,5,6</sup>

<sup>1</sup>Renal, Vascular and Diabetes Laboratory, IIS-Fundación Jimenez Diaz UAM, Madrid, Spain, <sup>2</sup>Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Madrid, Spain, <sup>3</sup>Division of Nephrology, Hospital Universitario de Burgos, Burgos, Spain, <sup>4</sup>Division of Nephrology and Hypertension, IIS-Fundación Jimenez Diaz UAM, Madrid, Spain, <sup>5</sup>Department of Medicine, UAM, Madrid, Spain and <sup>6</sup>Spanish Kidney Research Network (REDINREN), Madrid, Spain

\*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: Emilio Gonzalez-Parra; E-mail: EGParra@fjd.es; Twitter handle: @CKJ\_EiC

## ABSTRACT

**Background.** Bisphenol S (BPS) is a structural analogue of bisphenol A (BPA) that is found in the environment. BPS may accumulate in anuric patients due to decreased urinary excretion. The toxicity and health effects of BPS are poorly characterized.

**Methods.** A cross-over study was performed using polynephron (PN) or polysulphone (PS) dialysers for a short (1 week each, 14 patients) or long (3 months each, 20 patients) period on each dialyser. Plasma BPA, BPS and hippuric acid were assessed by SRM mass spectrometry (SRM-MS). The biological significance of the BPS concentrations found was explored in cultured kidney tubular cells.

**Results.** In haemodiafiltration (HDF) patients, plasma BPS was 10-fold higher than in healthy subjects ( $0.53 \pm 0.52$  versus  $0.05 \pm 0.01$  ng/mL;  $P = 0.0015$ ), while BPA levels were 35-fold higher ( $13.23 \pm 14.65$  versus  $0.37 \pm 0.12$  ng/mL;  $P = 0.007$ ). Plasma hippuric acid decreased after an HDF session, while BPS and BPA did not. After 3 months of HDF with the same membranes, the BPS concentration was  $1.01 \pm 0.87$  ng/mL for PN users and  $0.62 \pm 0.21$  ng/mL for PS users ( $P$  non-statistically significant). *In vitro*, BPS and BPA leaked from dialysers containing them. In cultured tubular cells, no biological impact (cytotoxicity, inflammatory and oxidative stress gene expression) was observed for BPS up to 200  $\mu$ M, while BPA was toxic at concentrations  $\geq 100$   $\mu$ M.

**Conclusions.** BPS may be released from dialysis membranes, and dialysis patients display high BPS concentrations. However, BPS concentrations are lower than BPA concentrations and no BPS toxicity was observed at concentrations found in patient plasma.

**Keywords:** bisphenol A, bisphenol S, chronic kidney disease, haemodialysis, haemodiafiltration, toxins, xenobiotics

Received: 30.8.2019; Editorial decision: 30.3.2020

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press on behalf of ERA-EDTA. All rights reserved.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

## INTRODUCTION

Bisphenol A (BPA) is a chemical component of polycarbonate plastics and epoxy resins used to manufacture consumer products such as coatings and packaging of food cans, which represent the main source of exposure, baby bottles and toys, dental materials, personal care products and paper products such as paper bills and cashier receipts [1, 2]. In recent years, many studies have demonstrated adverse effects of BPA on perinatal, childhood and adult health including diabetes, reproductive disorders, cardiovascular disease and kidney disease, among others [3, 4]. The health risk is particularly high for kidney patients due to the urinary excretion of BPA. In this regard, serum BPA levels are increased in haemodialysis (HD) patients [4, 5] and in 2015, the EU SCENIHR experts report on 'The safety of the use of bisphenol A in medical devices' recommended the elimination of BPA from medical materials used in dialysis patients [6]. As a result, in the 2000s, industries started replacing BPA with analogues such as bisphenol S (BPS) or bisphenol F. BPS is a structural analogue of BPA where the central quaternary carbon has been replaced by a sulphone and two hydroxyl groups, rendering it stronger in terms of resistance to acidity, heat and sunlight than BPA. Due to these similarities, it has replaced BPA for many uses [7]. In fact, an association has been described between the urinary excretion of BPS and BPA [8].

Exposure to BPS occurs on a daily basis through ingestion, inhalation and dermal contact, but urine concentrations are lower than for BPA, probably reflecting a lower industrial use as compared with BPA [9]. Although BPS metabolism is not fully understood, in *in vitro* (human cells) and *in vivo* studies in mice and zebrafish, BPS is metabolized mainly by Phase II reactions, resulting in BPS sulphate and BPS glucuronide. BPS excretion is mainly via the urine, as BPS glucuronide (97%), although BPS has also been found in faeces [10].

The possible toxicity and health effects of BPS are less well known than those of BPA. However, different *in vitro* and *in vivo* exposure studies suggest that BPS and its metabolites could act as endocrine disruptors, having weak oestrogenic receptor agonistic [7] or antiandrogenic activity [3, 11], and interfering with thyroid function [12]. BPS also decreased the viability of proliferating adipose stromal cells [13] and testosterone secretion by human testes [14, 15], and disturbed the developing nervous system in zebrafish larvae [16]. In addition, BPS exposure was associated with oxidative stress in cultured hepatocytes and erythrocytes and rats [7, 17, 18]. This may be related to the induction of mitochondrial dysfunction [19]. Genotoxic damage and mutagenesis have also been observed [20]. BPS may also stimulate liver glycogenolysis and/or gluconeogenesis [21] and contribute to the progression of breast cancer, as it induced epigenetic and transcriptional changes in the human breast cancer cell line MCF-7 [22, 23]. A 2015 review characterized BPS as an endocrine disruptor potentially having the same health hazards as BPA [3]. However, many of these studies have been criticized because BPS concentrations were orders of magnitude higher than those occurring in the environment [24]. In this regard, elevated urinary BPA was associated with oxidative stress markers, but this was not the case for urinary BPS [25]. In any case, little or nothing is known about BPS effects on humans. Specifically, little is known about circulating BPS concentrations in humans with chronic kidney disease (CKD), a condition in which not only is urinary BPS excretion compromised, but also patients may be exposed to BPS intravenously. BPS is a component of certain dialysis membranes, in which it forms a copolymer with BPA in the synthesis of polysulphone (PS), currently the most

commonly used dialysis membrane. Additionally, BPS is also a major component in alternative dialysis membranes such as polyethersulphone, also known as polynephron (PN) or polyester polymer alloy. Thus, by analogy to BPA, we hypothesized that HD patients may be exposed parenterally to this compound during the dialysis session as a result of its release from dialysis membranes and that this, associated with anuria, may increase circulating BPS to potentially toxic levels in these patients. In this regard, BPS and BPA are partially hydrophobic and are usually bound to plasma proteins, making it more difficult to eliminate during dialysis.

We have now explored the circulating levels of BPS in end-stage kidney disease (ESRD) patients on dialysis and the impact of commonly used dialysis membranes. Additionally, we explored the potential toxicity of clinically relevant BPS concentrations and compared them with BPA toxicity.

## MATERIALS AND METHODS

The study was approved by the IIS-Fundación Jiménez Díaz Ethics Committee and was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and the European Union Clinical Trial Directive (2001/20/EC). Patients were enrolled after providing written informed consent.

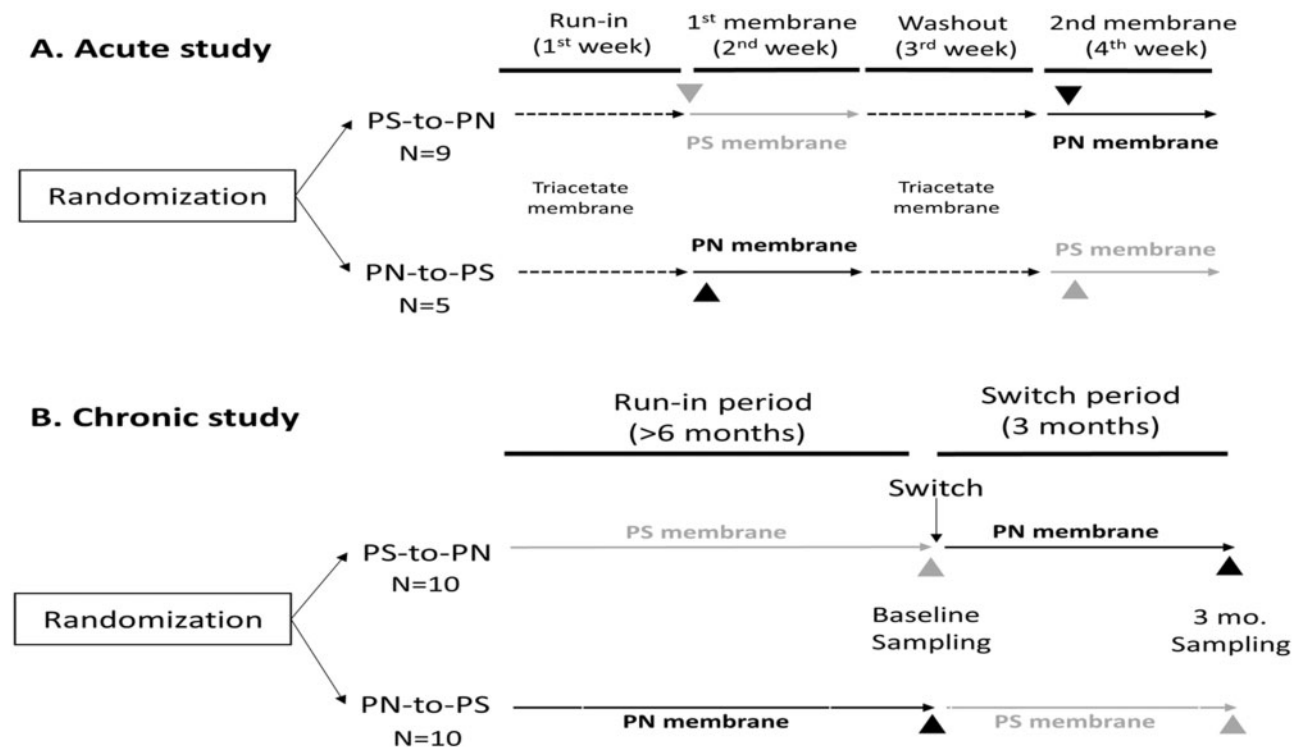
### Study design

Two different experimental designs were explored. The acute study (Figure 1) assessed the effects of a single haemodiafiltration (HDF) session on BPS levels: 14 patients on HDF were recruited with the following inclusion criteria: arteriovenous fistula that guaranteed flows of 350–400 mL/mL,  $K_t/V_{urea} > 1.2$  and a diuresis <500 mL/day, and who provided signed informed consent. After a run-in period of 1 week dialysed with a cellulose triacetate membrane (three sessions), pre- and post-dialysis blood samples were drawn for the first HDF session with the study synthetic membrane (Membrane 1: PS or PN). After a week of HDF with this membrane, a washout period of 1 week on cellulose triacetate membrane was followed by 1 week in which the alternative synthetic membrane was used (Membrane 2: PN or PS). Again, pre- and post-dialysis blood samples were drawn for the first HDF session with the study synthetic membrane.

In the chronic study (Figure 1B), the accumulation of BPA in patients on long-term online HDF (OL-HDF) was explored. Briefly, this was a previously described prospective 9-month crossover study in which we compared BPA-free and BPA-containing dialysers in 72 patients on OL-HDF [5]. Dialysers only differed in the BPA content in the dialysis membrane. Specifically, BPA-free high-flux PN membranes (Elisio, NiproCorp, Osaka, Japan) were compared with high-flux PS (Helixone®) dialysers that contain BPA (Fxx80, Fresenius, Bad Homburg, Germany). Blood for BPS assessment was drawn at the start of the dialysis session (pre-dialysis) after a run-in period of at least 6 months with the study membrane as well as after 3 months with the switch (alternative) membrane. For BPS assessment, samples were available from 10 patients in each arm of the study (20), and 14 samples from the short-term study.

Table 1 summarizes patient characteristics for both studies. All patients used the same dialysis monitors (5008 model, Fresenius). This model is equipped with two PS ultrafilters to filter ultrapure water before the monitors make the dialysis fluid. The housing material is polypropylene, while the potting material is polyurethane. Before the study, patients were dialysed with Elisio 21 H or Fxx80 membranes, which are the two





**FIGURE 1:** Experimental design: impact of dialysis membrane on plasma BPA, BPS and hippuric acid concentration. (A) Acute study. After a 1 week run-in using a control membrane (triacetate), blood was drawn pre- and post-dialysis during the first session with the study membrane (PN or PS) to assess the impact of different membranes on plasma analyte concentration. Following 1 week of triacetate membrane washout, the study was repeated with a different membrane (PN or PS). (B) Chronic study. Blood was only drawn pre-dialysis following at least 6 months of run-in with the study membrane (PN or PS) and after 3 months of dialysis with alternative (switch) membrane.

**Table 1. Patient characteristics of both populations measured. Expressed as mean  $\pm$  SD.**

Variable	Acute study (n = 14)	Chronic study (n = 20)
Age, years	64 $\pm$ 14	65.8 $\pm$ 16.3
Female sex, n (%)	3/12 (25)	6/14 (30)
Dialysis vintage, months	74 $\pm$ 53	93 $\pm$ 38
Qd, mL	641 $\pm$ 20	620 $\pm$ 35
Qb, mL	390 $\pm$ 24	402 $\pm$ 28
K <sub>t</sub> /V	1.76 $\pm$ 0.32	1.77 $\pm$ 0.25
Residual diuresis	>200	>200
Infusion fluid, L	19.90 $\pm$ 0.12	24.95 $\pm$ 2.85

membranes routinely available in our centre for patients without suspected hypersensitivity reactions. In the latter, cellulose triacetate is used.

### Clinical and biochemical variables

Fasting blood samples were drawn from the arteriovenous fistula just prior to a midweek dialysis session and plasma was frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Laboratory parameters were assessed by automated blood analysers (Advia 2400 chemistry system and Advia 2120 haematology system, Siemens).

### Sample and standard preparation

Plasma samples were prepared to assess the total plasma concentration of BPA, BPS and hippuric acid by liquid-liquid

extraction with methanol (1:5) on 100  $\mu\text{L}$  plasma. Samples were treated with glucuronidase/sulphatase in ammonium acetate 1M pH 7 with 20% methanol overnight, as described by Völkel et al. [26] with modifications. BPA, BPS and hippuric acid standards were analytical standard grade (99%) from Supelco/Sigma-Aldrich Química, S.L. (Madrid, Spain).

### Total BPA, BPS and hippuric acid plasma measurements by SRM-MS

Plasma BPA, BPS and hippuric acid concentrations were assessed using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (MS) on a Shimadzu triple quadrupole LC-MS/MS system (LCMS-8060; Shimadzu, Japan) equipped with an electrospray ionization source working in the negative multiple reaction mode. Conditions for combined assessment were optimized at the UCM MS facility, injecting 10  $\mu\text{L}$  of treated samples on a reverse-phase column (Phenomenex Gemini 5  $\mu$  C18 110 A 150  $\times$  2 mm, Torrance, CA, USA) using a gradient of water/methanol at 0.3 mL/min for analyte separation. The observed transitions were for BPA 227.2  $\rightarrow$  212.05 CE = +18 V and 227.2  $\rightarrow$  133.10 CE = +25 V; for BPS 249.3  $\rightarrow$  108.1 CE = +27 V and 249.3  $\rightarrow$  92.05 CE = +35 V; and for hippuric acid 178.0  $\rightarrow$  134.1 CE = +18 V and 178.0  $\rightarrow$  77.15 CE = +25 V (Supplementary data, Figure S1).

Limits of detections were 0.05 ng/mL (ppb) for BPA and BPS and 3 ng/mL (ppb) for hippuric acid, while the limits of quantifications were 0.16 ng/mL (ppb) for BPS and BPA and 10 ng/mL (ppb) for hippuric acid.

## Nuclear magnetic resonance characterization of BPS content in dialyser fibres

Dialyser fibres were characterized using monodimensional experiments of <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C normal and <sup>13</sup>C edited (DEPT-135) and two-dimensional homo- and heteronuclear experiments (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC edited and <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC) of nuclear magnetic resonance using chloroform and deuterated dimethyl sulphoxide (DMSO) according to the sample under study. For Fx80 dialyser fibres, 8.0 mg were dissolved in 500 µL deuterated chloroform and for Elisio-19H dialyser fibres, 7.4 mg were dissolved in 500 µL deuterated DMSO and 200 µL deuterated chloroform. Analyses were performed on a Bruker Avance III HD 500 MHz spectrometer equipped with an indirect triple TBI 1H/31P/BB probe.

## In vitro studies

**Cell culture and reagents.** Human renal proximal tubular epithelial cells (HK-2 cell line, ATCC CRL-2190) were cultured in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), with 10% heat-inactivated foetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 µg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin, insulin transferrin selenite (5 µg/mL) and hydrocortisone (36 ng/mL) in 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. BPA and BPS were added to cell culture media and dose-response (200 nM, 500 nM, 1 µM, 10, 25, 50, 100 and 200 µM), and time-course experiments were performed to optimize experimental conditions. In some experiments, 20 mM bovine serum albumin was added to the culture media. All chemicals were of the highest grade and purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) unless otherwise noted. Stimuli were solubilized in DMSO. A steroid-free medium containing DMSO (0.5% v/v) was used as the control.

Cell viability was determined using the MTT assay (Sigma M2128) in 24-well plates (3 × 10<sup>4</sup> cells per well).

**Real-time PCR.** Total RNA was obtained using the Tripure isolation reagent (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). The quantity and purity of extracted RNA were assessed by measuring absorbance at 260 and 280 nm in a UV spectrophotometer (NanoDrop Inc., Wilmington, DE, USA). Only samples with an Abs 260:Abs 280 ratio up to 1.8 were used for reverse transcription and real-time PCR. Multiplex real-time PCR was performed using Applied Biosystems expression assays for Nrf-2 (Hs0097596\_m1), heme oxygenase (HO-1) (Hs01110250\_m1), NQO-1 (Hs00168547\_m1), interleukin (IL)-6 (Hs00174131\_m1) and Tumour necrosis factor-α (Hs00174128\_m1). Data were normalized with GAPDH VIC (Hs02786624\_g1).

## Statistical analysis

The distribution of continuous variables was assessed by the Shapiro-Wilk test. Variables were expressed as absolute and relative frequencies, mean and standard deviation (SD) or median and interquartile range (IQR), as appropriate. Comparisons between values were performed using Wilcoxon signed-rank test or Kruskal-Wallis test. All comparisons used the bilateral hypothesis test and a significance level of 0.05. One-way ANOVA was performed to compare pre- and post-dialysis values at baseline and after 3 months. Data analysis was performed in R (version 3.5.2, <https://cran.r-project.org/>).

## RESULTS

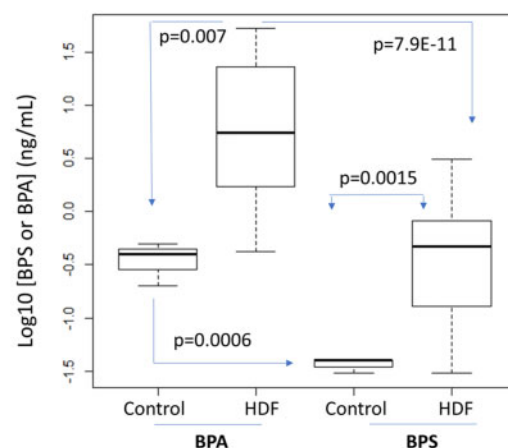
### High plasma BPS levels in patients with impaired renal function

Plasma total BPS (free, conjugated with sulphate or glucuronate, or bound to proteins) was assessed in 10 healthy subjects (blood donors) and in 14 patients with ESRD treated with HDF who had been dialysed for 1 week with cellulose triacetate membranes (Figure 1A). Most (*n* = 7) healthy controls had plasma BPS below the detection limit of the assay (0.05 ng/mL, 1 ppb) being the range of those that could be measured 0.05–0.07 ng/mL, while in HDF patients, pre-dialysis BPS was 0.54 ± 0.52 ng/mL [median (IQR) 0.47 (0.69)] (*P* = 0.0015 versus healthy controls) (Figure 2). In contrast, BPA concentrations were 13.23 ± 14.65 ng/mL [median (IQR) 5.51 (21.32)] in HDF patients and 0.37 ± 0.12 ng/mL [median (IQR) 0.4 (0.075)] in controls (*P* = 0.007) (Figure 2). BPS values were significantly lower than BPA values both in healthy individuals (*P* = 0.0006) and in HDF patients (*P* = 7.9E-11).

### Plasma BPS concentration does not change while hippuric acid decreases during a single HDF session

Plasma BPS concentration was assessed at the start (pre-dialysis) and at the end (post-dialysis) of the HDF session using different dialysis membranes, following 1 week on the same membrane, and was compared with BPA and with a uraemic toxin of similar molecular weight (179 g/mol versus 228 g/mol) and closer hydrophobicity characteristics than other uraemic toxins (hippuric acid). PN membranes are BPA-free but contain BPS, while PS contains both BPA and BPS. Neither BPA (Table 2 and Figure 3A) nor BPS (Table 3 and Figure 3B) concentrations changed significantly during the HDF session.

In contrast, the concentration of hippuric acid significantly decreased during the HDF session with either membrane (Figure 3C).



	BPA (ng/mL)	BPS (ng/mL)
Healthy controls	0.37 ± 0.12	0.05–0.07
ESRD hemodialfiltration patients	13.23 ± 14.65	0.54 ± 0.52

FIGURE 2: Acute study. Plasma BPA and BPS in HDF patients and healthy controls (Experimental design 1 in Figure 1A). A boxplot of logarithmic representation of BPA and BPS values. The table shows mean and SD.

### Bioaccumulation of BPS in ESRD patients

To assess the potential bioaccumulation of BPS during long-term HDF, we designed a chronic study (Figure 1B). This study used pre-dialysis plasma concentrations after 3–6 months using the same dialysis membrane as a marker of BPA or BPS accumulation.

In this population ( $n = 20$ ), MS analysis did not disclose statistically significant differences between plasma BPA concentration in patients on long-term PS compared with those on long-term PN dialysers [ $26.55 \pm 35.01$  ng/mL, median (IQR) 13.94 (28.62) versus  $8.74 \pm 12.08$  ng/mL, median (IQR) 2.85 (7.54), NS; Figure 3D], although consistent with prior results in a larger sample ( $n = 72$ ) using ELISA to assess pre-dialysis BPA levels after the long-term use of BPA-containing membranes in either HD [4] or HDF [5], values on PS were numerically higher.

For BPS concentration, no significant differences were observed between patients on long-term PS and those on long-

term PN dialysers [ $0.62 \pm 0.21$  ng/mL, median (IQR) 0.56 (0.21) versus  $1.01 \pm 0.87$  ng/mL, median (IQR) 0.76 (0.78),  $P = \text{NS}$ ] (Figure 3E).

There were no differences in hippuric acid concentrations [PS  $39.64 \pm 31.60$   $\mu\text{g/mL}$ , median (IQR) 37.88 (26.86), versus PN  $44.24 \pm 64.47$   $\mu\text{g/mL}$ , median (IQR) 28.24 (29.77), NS] (Figure 3F).

### Leaking of BPA and BPS from dialyser membranes

The source of bisphenols is expected to be the release from plastics that compose the dialysis system. A first analysis did not disclose the presence of measurable free BPS or BPA in the dialyser PN or PS fibres. However, incubation of dialyser fibres under physiological conditions (37 C in culture media) for 24 h allowed the detection of quantifiable amounts of BPS and/or BPA monomers for both PN (BPS 100 ng/mL from 10 mg PN fibres) and PS (BPS 1960 ng/mL and BPA 8060 ng/mL, from 10 mg PS fibres).

**Table 2.** Plasma BPA concentration before and after single HDF session with different membranes following 1 week on the same membrane

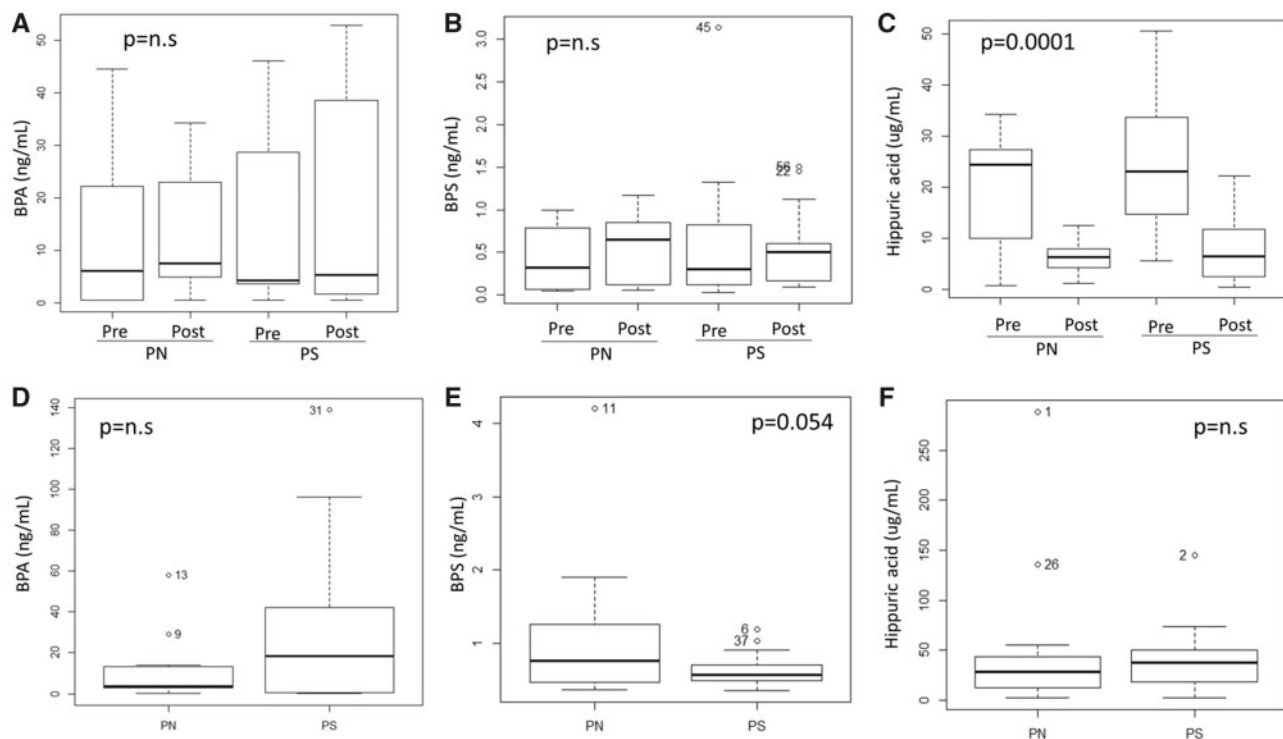
	BPA (ng/mL)	
	Mean $\pm$ SD	Median (IQR)
PN pre-dialysis	$11.51 \pm 13.55$	6.12 (19.86)
PN post-dialysis	$12.42 \pm 11.10$	7.54 (15.98)
PS pre-dialysis	$13.17 \pm 14.81$	4.27 (23.41)
PS post-dialysis	$15.83 \pm 19.25$	5.31 (30.68)

No significant differences were observed when comparing pre- versus post-HDF values.

**Table 3.** Plasma BPS concentrations before and after single HDF session with different membranes following 1 week on the same membrane

	BPS (ng/mL)	
	Mean $\pm$ SD	Median (IQR)
PN pre-dialysis	$0.42 \pm 0.35$	0.32 (0.65)
PN post-dialysis	$0.56 \pm 0.36$	0.64 (0.68)
PS pre-dialysis	$0.59 \pm 0.82$	0.30 (0.61)
PS post-dialysis	$0.58 \pm 0.47$	0.51 (0.37)

No significant differences were observed when comparing pre- versus post-HDF values.



**FIGURE 3:** Acute and chronic studies. Plasma analyte concentration in HDF patients on different membranes. (A–C) Acute study (Experimental design in Figure 1A). Plasma concentrations of BPA (A), BPS (B) and hippuric acid (C) pre- and post-HDF session using different membranes: PN and PS. (D–F) Chronic study (Experimental design in Figure 1B). Pre-dialysis plasma concentrations for BPA (D), BPS (E) and hippuric acid (F) after at least 3 months using the same membrane for HDF. Data correspond to the average of baseline and 3-month sampling for each dialysis membrane. Please note the different scales for different analytes.

### In vitro cytotoxicity of BPS and BPA

To assess the potential clinical significance of BPS found in ESRD patient plasma, we compared BPS toxicity with that of equimolar concentrations of BPA, a well-characterized toxin for, among others, kidney tubular cells. In the chronic study, the mean plasma BPA values of the whole group, combining both dialyser membranes, was 17.7 ng/mL (77.5  $\mu$ M), while the highest concentration was 81.1 ng/mL (350  $\mu$ M). Respective figures for BPS were 1.01 ng/mL (3.99  $\mu$ M) and 4.21 ng/mL (16  $\mu$ M).

Thus, we explored the impact of a concentration range of 200 nM to 200  $\mu$ M free BPA or BPS over the MMT-assessed survival of cultured human tubular epithelial cells cultured in presence of albumin and survival factors contained in FCS. BPA was cytotoxic at concentrations of 100  $\mu$ M or higher, while BPS was not toxic within this clinically relevant concentration range, consistent with contrast phase microscopy results (Figure 4A and B).

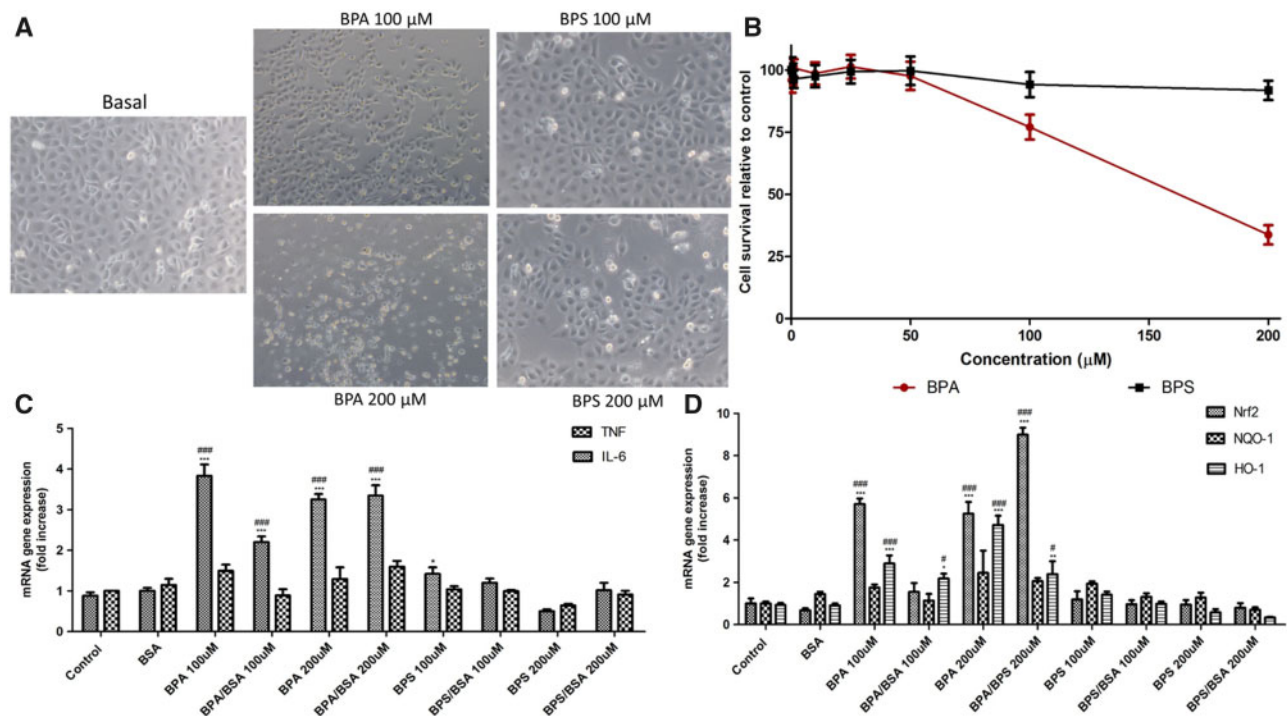
### Oxidative and inflammatory responses to BPS

We further explored the non-lethal effects of high BPS and BPA concentrations on the expression of genes coding for inflammatory cytokines or proteins of the oxidative stress response. BPS and BPA were studied in the absence or presence of albumin since they bind to albumin in the circulation. Free BPA or albumin-bound BPA increased the gene expression of IL-6 and the master regulator of oxidative stress-protective responses Nrf2 as well as its target HO-1; Figure 4C and D). Even the highest BPS concentrations tested did not elicit significant proinflammatory or oxidative stress responses (Figure 4C and D).

### DISCUSSION

BPS is a molecule that is widely used to replace BPA, but due to the structural similarities between these two molecules, the question arises whether BPS can be considered a safe replacement. BPS safety is particularly important for CKD patients. We now provide three key pieces of clinically relevant information: BPS accumulates in anuric patients undergoing HDF and it may leak from dialysis membranes, providing a source for this xenobiotic in dialysis patients. However, plasma BPS levels are considerably lower than BPA levels and in the human cell culture system used it was less toxic than BPA, even at concentrations >10-fold higher than those found in patients and after assessing sensitive sublethal responses associated to cell stress.

Exposure to BPS in the general population is still small. The estimated daily intake in China was <0.25 ng/kgbody weight/day for each detected BPS, much lower than the tentative oral reference dose values for BPA (4  $\mu$ g/kgbw/day) recommended by the European Food Safety Authority [27]. In urine studies, BPA was detected in  $\geq$ 85% of the spot samples, while BPS could be measured only in 13% of the samples [25]. Our results are in line with these observations since plasma BPS was undetectable or just above the detection limit in healthy subjects, a reflection of a lower environmental exposure than to BPA. However, despite the lower environmental exposure of general populations to this compound, in this study, it is observed for the first time that plasma BPS concentration is increased in patients with CKD in HD, suggesting accumulation in these patients. The mechanisms underlying the accumulation are likely the same as for BPA: lack of renal elimination being the main cause, together with the potential transfer from dialysis membranes [4]. Still, plasma BPS values were much lower than BPA values, which together with the lower observed cytotoxicity are



**FIGURE 4:** Comparison of the cytotoxicity and pro-inflammatory and pro-oxidants effects in BPS and to BPA in renal tubular cells (HK-2). (A) Representative contrast phase micrographs after 24 h of stimulation. Dead cells display birefringence. (B) Dose-response cell survival at 24 h assessed by the MTT assay. (C) Expression of inflammatory gene mRNA in response to BPA or BPS stimulation for 24 h in presence or absence of albumin (BSA). (D) Gene expression of Nrf2, NQO-1 and HO-1 mRNA under the same experimental conditions as in C.



reassuring. However, much remains to be understood about BPS in HD, such as whether it may accumulate in certain cell types or organs (selective deposition), what is the pharmacokinetics in patients in ESRD and whether long-term exposure may be toxic or whether it may have cell type-specific toxicity.

Our data are consistent with dialysers being a potential source of BPS for dialysis patients, although again, the lower leakage values of BPS versus BPA are reassuring. This aspect, as far as we know, has not been published despite manufacturers' need to evaluate it to comply with sanitary device specifications in each country. The marginal percentage of free monomers, similar in both types of fibres, is expected in a device for medical use. Similarly, both fibres are quite stable under the conditions found in dialysis, with the quantities measured being minimal but appreciable in both cases.

Similar to previous findings in larger HD [4] and OL-HDF [5] studies for BPA, the chronic use of BPA-containing dialysers is associated with non-statistically significant, numerically higher plasma BPA levels than the use of BPA-free dialysers, suggesting BPA accumulation. The limited sample size may have precluded observing statistically significant differences described in prior larger studies. Regarding BPS, both dialysers contained this molecule, and plasma BPS was higher in HD patients than in healthy individuals. However, studies using BPS-free dialysers are required to further characterize the relative contribution of dialysers versus other environmental sources to BPS

accumulation in ESRD patients, as BPS accumulation has been described in non-dialysis CKD patients. Thus, in a recent study from China, serum BPA and BPS were found to increase with decreasing kidney function and to be higher in HD than in PD patients, suggesting release from HD equipment, and thus supporting our findings [28, 29].

The other relevant question for the renal patient is the acute and chronic toxicity of BPS. There is an extensive literature on BPA toxicity through different mechanisms, including interference with mitochondrial function [30] (Figure 5). It can be hypothesized that BPS may also be toxic by recruiting similar mechanisms. However, the literature on BPS toxicity is scarce and frequently marred by the use of very high concentrations without clinical relevance [13, 31–34]. Additionally, the blood-placental barrier is more efficient in limiting foetal exposure to BPS than to BPA [35]. Thus, despite the cross-sectional association of urinary bisphenols, including BPA and BPS, with human diabetes mellitus, a nonlinear positive association between lower concentrations and diabetes mellitus was only observed for BPA [8]. Our results, testing clinically relevant concentrations of BPA and BPS concentrations >10-fold higher than the clinically relevant ones, are consistent with lower toxicity of BPS. It should be remembered that tubular cells may also be a source of systemic inflammation and may play important functions even in dialysis patients, by synthesizing proteins such as the anti-ageing factor Klotho and calcitriol [36, 37]. Since systemic

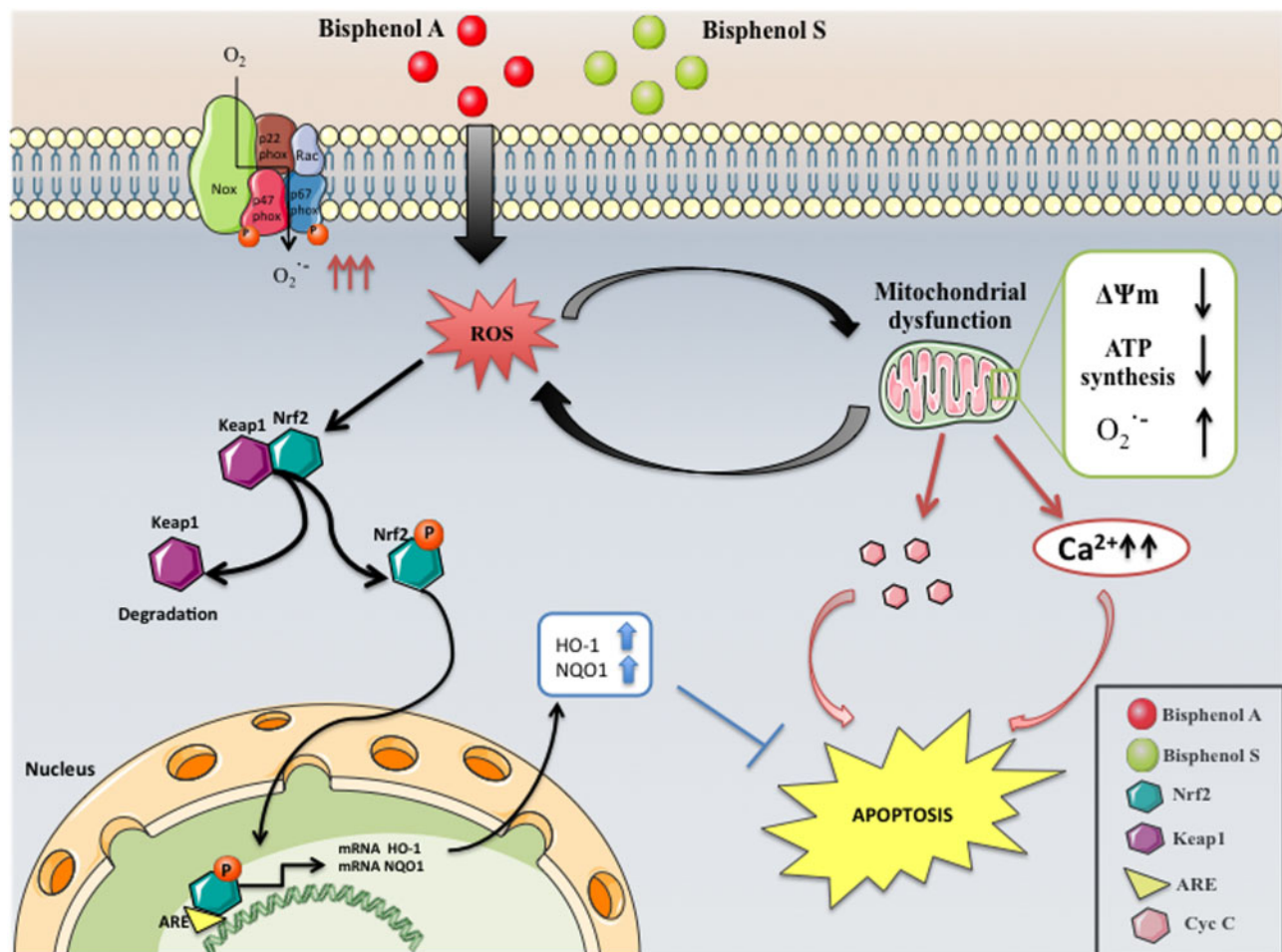


FIGURE 5: Graphical abstract of known and hypothesized mechanisms of BPA cytotoxicity and major pathways involved. BPS was not found to activate the same pathways at the concentrations studied.



inflammation downregulates tubular cell Klotho expression [36] and preservation of Klotho expression during AKI is nephroprotective [38], it may be speculated that the choice of membranes may have potential effects on recovery of renal function. However, this hypothesis should be tested experimentally.

Our study had several limitations. Thus, the sample size was relatively small, although large enough to observe significant differences for hippuric acid. Due to scarce information at the time of design of the study, the 1-week washout period was chosen empirically, and it may not have been the optimal washout period. In any case, patients were randomized to the initial test membrane and then crossover was performed. Furthermore, we did not study tissue levels of BPA or BPS, and the chronic study was relatively short (months) with respect to the potential decades' survival on chronic HD. Thus, we cannot exclude the long-term consequences of tissue BPS accumulation. Finally, regarding the cell system to assess toxicity, we cannot exclude potential toxic effects of BPS to other readouts or cell systems upon longer exposure.

In conclusion, despite synthetic dialysis membranes being a potential source of the high BPS levels in HD patients, the toxicity profile of BPS is safer than for BPA, at least for the parameters measured in this study. However, the precautionary principle should prevail, and BPS cannot be considered harmless for patients with ESRD until detailed prospective studies confirm its long-term safety.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at ckj online.

## FUNDING

The Renal, Vascular and Diabetes Laboratory is funded by Ministerio de Economía, Industria y competitividad: FIS ISCIII FEDER funds PI16/01298, PI15/00298, PI16/02057, PI16/01900, PI 17/01495, ISCIII-RETIC REDinREN RD12/0021 RD16/0009, CYTED IBERERC and Sociedad Madrileña de Nefrología. This work was supported by a grant from Nipro corporation and Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo (FRIAT), and A.R.-P. was funded by grant from the Fundación Conchita Rábago.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

E.G.-P. is a recipient of a grant from Nipro corporation for the study of bisphenol A in kidney patients. The funders had no role in the design of the study, interpretation of the results or the writing of the manuscript.

## REFERENCES

- Dodds EC, Goldberg L, Lawson W et al. Oestrogenic activity of certain synthetic compounds. *Nature* 1938; 141: 247–248
- Molina-Molina JM, Jiménez-Díaz I, Fernández MF et al. Determination of bisphenol A and bisphenol S concentrations and assessment of estrogen- and anti-androgen-like activities in thermal paper receipts from Brazil, France, and Spain. *Environ Res* 2019; 170: 406–415
- Rochester JR, Bolden AL. Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. *Environ Health Perspect* 2015; 123: 643–650
- Bosch-Panadero E, Mas S, Sanchez-Ospina D et al. The choice of hemodialysis membrane affects serum bisphenol A levels. *J Am Soc Nephrol* 2016; 1–10
- Mas S, Bosch-Panadero E, Abaigar P et al. Influence of dialysis membrane composition on plasma bisphenol A levels during online hemodiafiltration. *PLoS One* 2018; 13: e0193288
- Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. The Safety of the Use of Bisphenol A in Medical Devices. [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/emerging/docs/scenihr\\_o\\_040.pdf](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_040.pdf) 2015
- Wu LH, Zhang XM, Wang F et al. Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: a short review. *Sci Total Environ* 2018; 615: 87–98
- Duan Y, Yao Y, Wang B et al. Association of urinary concentrations of bisphenols with type 2 diabetes mellitus: a case-control study. *Environ Pollut* 2018; 243: 1719–1726
- Liao C, Liu F, Guo Y et al. Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the United States and several Asian countries: implications for human exposure. *Environ Sci Technol* 2012; 46: 9138–9145
- Song Y, Xie P, Cai Z. Metabolism of bisphenol S in mice after oral administration. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2018; 32: 495–502
- Kojima H, Takeuchi S, Sanoh S et al. Profiling of bisphenol A and eight its analogues on transcriptional activity via human nuclear receptors. *Toxicology* 2019; 413: 48–55
- Zhang YF, Ren XM, Li YY et al. Bisphenol A alternatives bisphenol S and bisphenol F interfere with thyroid hormone signaling pathway in vitro and in vivo. *Environ Pollut* 2018; 237: 1072–1079
- Berni M, Gigante P, Bussolati S et al. Bisphenol S, a Bisphenol A alternative, impairs swine ovarian and adipose cell functions. *Domest Anim Endocrinol* 2019; 66: 48–56
- Eladak S, Grisin T, Moison D et al. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil Steril* 2015; 103: 11–21
- Desdoits-Lethimonier C, Lesné L, Gaudriault P et al. Parallel assessment of the effects of bisphenol A and several of its analogs on the adult human testis. *Hum Reprod* 2017; 32: 1465–1473
- Gu J, Zhang J, Chen Y et al. Neurobehavioral effects of bisphenol S exposure in early life stages of zebrafish larvae (Danio rerio). *Chemosphere* 2019; 217: 629–635
- Macczak A, Cyrkler M, Bukowska B et al. Bisphenol A, bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce different oxidative stress and damage in human red blood cells (in vitro study). *Toxicol In Vitro* 2017; 41: 143–149
- Ullah H, Jahan S, Ain QU et al. Effect of bisphenol S exposure on male reproductive system of rats: a histological and biochemical study. *Chemosphere* 2016; 152: 383–391
- Nakagawa Y, Tayama S. Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol* 2000; 74: 99–105
- Fic A, Zegura B, Sollner Dolenc M et al. Mutagenicity and DNA damage of bisphenol A and its structural analogues in hep2 cells. *Arch Ind Hyg Toxicol* 2013; 64: 189–200
- Rezg R, Abot A, Mornagui B et al. Bisphenol S exposure affects gene expression related to intestinal glucose absorption and glucose metabolism in mice. *Environ Sci Pollut Res* 2019; 26: 3636–3642
- Huang W, Zhao C, Zhong H et al. Bisphenol S induced epigenetic and transcriptional changes in human breast cancer cell line MCF-7. *Environ Pollut* 2019; 246: 697–703

23. Zhang Y, Dong T, Hu W et al. Association between exposure to a mixture of phenols, pesticides, and phthalates and obesity: comparison of three statistical models. *Environ Int* 2019; 123: 325–336
24. Lee S, Kim C, Shin H et al. Comparison of thyroid hormone disruption potentials by bisphenols A, S, F, and Z in embryonic larval zebrafish. *Chemosphere* 2019; 221: 115–123
25. Wang YX, Liu C, Shen Y et al. Urinary levels of bisphenol A, F and S and markers of oxidative stress among healthy adult men: variability and association analysis. *Environ Int* 2019; 123: 301–309
26. Völkel W, Colnot T, Csanády GA et al. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 2002; 15: 1281–1287
27. Zhang H, Zhang Y, Li J, Yang M. Occurrence and exposure assessment of bisphenol analogues in source water and drinking water in China. *Sci Total Environ* 2019; 655: 607–613
28. Kuo CC, Huang JK, Chou CT et al. Effect of bisphenol A on Ca<sup>2+</sup> fluxes and viability in Madin-Darby canine renal tubular cells. *Drug Chem Toxicol* 2011; 34: 454–461
29. Shen Y, Liu T, Shi Y et al. Bisphenol A analogs in patients with chronic kidney disease and dialysis therapy. *Ecotoxicol Environ Saf* 2019; 185: 109684
30. Bosch-Panadero E, Mas S, Civantos E et al. Bisphenol A is an exogenous toxin that promotes mitochondrial injury and death in tubular cells. *Environ Toxicol* 2018; 33: 325–332
31. Wang W, Zhang X, Qin J et al. Long-term bisphenol S exposure induces fat accumulation in liver of adult male zebrafish (*Danio rerio*) and slows yolk lipid consumption in F1 offspring. *Chemosphere* 2019; 221: 500–510
32. Speidel JT, Xu M, Abdel-Rahman SZ. Bisphenol A (BPA) and bisphenol S (BPS) alter the promoter activity of the ABCB1 gene encoding P-glycoprotein in the human placenta in a haplotype-dependent manner. *Toxicol Appl Pharmacol* 2018; 359: 47–54
33. Berto-Júnior C, Santos-Silva AP, Ferreira ACF et al. Unraveling molecular targets of bisphenol A and S in the thyroid gland. *Environ Sci Pollut Res Int* 2018; 25: 26916–26926
34. Lin Z, Zhang X, Zhao F, Ru S. Bisphenol S promotes the cell cycle progression and cell proliferation through ER $\alpha$ -cyclin D-CDK4/6-pRb pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2019; 366: 75–82
35. Grandin FC, Lacroix MZ, Gayraud V et al. Is bisphenol S a safer alternative to bisphenol A in terms of potential fetal exposure? Placental transfer across the perfused human placenta. *Chemosphere* 2019; 221: 471–478
36. Moreno JA, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD et al. The inflammatory cytokines TWEAK and TNF $\alpha$  reduce renal klotho expression through NF $\kappa$ B. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 1315–1325
37. Fernandez-Fernandez B, Izquierdo MC, Valiño-Rivas L et al. Albumin downregulates Klotho in tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* 2018; 33: 1712–1722
38. Liao HK, Hatanaka F, Araoka T et al. In vivo target gene activation via CRISPR/Cas9-mediated trans-epigenetic modulation. *Cell* 2017; 171: 1495–1507.e15